

Aus der Augenklinik und Poliklinik
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Siegfried Priglinger

**Pharmakologische Therapie des metastasierten
Aderhautmelanoms:
Bewertung neuer Wirkstoffe in der Zellkultur**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
André Alexander Julian Kafka

aus
Landshut

Jahr
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Kirsten H. Eibl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Lucie Heinzerling
PD Dr. Ulrich C. Schaller

Mitberichterstattung durch den
promovierten Betreuer: Dr. Christian Wertheimer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2021

Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	3
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
3	EINFÜHRUNG	7
3.1	Die Aderhaut	7
3.2	Das Aderhautmelanom	7
3.3	Metastasierung des Aderhautmelanoms	8
3.4	Therapie des primären Aderhautmelanoms	9
3.5	Molekulargenetische Grundlagen des Aderhautmelanoms	10
3.6	Genetische Mutationen beim Aderhautmelanom	15
3.7	Bisherige Therapie der Metastasierung	16
3.8	Selumetinib	18
3.9	Trametinib	18
3.10	Everolimus	18
3.11	Erlotinib	19
3.12	Erufosin	19
4	ZIELSETZUNG	20
5	MATERIAL UND METHODEN	22
5.1	Rahmenbedingungen, Methoden der Zellkultur, Zelllinien, Pharmaka	22
5.2	Bestimmung der Zellviabilität von OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen unter Erlotinib, Selumetinib, Trametinib, Everolimus und Erufosin mithilfe der Absorptionsmessung im XTT-Assay	23
5.3	Untersuchung der Zellviabilität von OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen unter Erlotinib, Selumetinib, Trametinib, Everolimus und Erufosin mithilfe des Double-stain-apoptosis-detection-Farbstoff-Ausschlusstest	24
5.4	Bestimmung der antiproliferativen Wirkung der Pharmaka an OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen mithilfe der Absorptionsmessung im XTT-Assay	25
5.5	Statistische Auswertung	26
6	ERGEBNISSE	27
6.1	Proliferation von OMM2.3, OMM2.5 und OMM1 Zellen und IC ₅₀ -Bestimmung von Erlotinib, Selumetinib, Trametinib, Everolimus und Erufosin	27

6.2	Erlotinib, Selumetinib, Trametinib, Everolimus, Erufosin und deren Wirkung auf die Zellviabilität am Zellkulturmodell von OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen.....	32
7	DISKUSSION	45
8	ZUSAMMENFASSUNG.....	55
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	57
10	DANKSAGUNG	69
11	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	70

Abkürzungsverzeichnis

AFIP	Armed Forces Institute of Pathology
AKT	Proteinkinase-B
ALL.....	akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Alkylphosphocholine
ATCC	American Type Culture Collection
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
COMS.....	Collaborative Ocular Melanoma Study
cPLA2	zytosolische Phospholipase-A2
CTLA-4	zytotoxisches T-lymphozyten-assoziiertes Antigen-4
DDX43.....	Dead-Box Helicase 43
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EIF1AX	eukaryotischer Translations-Initiierungs-Faktor 1A, X-linked
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinasen
FBS.....	fetales Kalbsserum
FOXO	Forkhead-box-O
GDP.....	Guanosindiphosphat
GIT	Gastrointestinaltrakt
GNA11	G Protein Subunit Alpha 11
GNA14	G Protein Subunit Alpha 14
GNA15/16.....	G Protein Subunit Alpha 15/16
GNAQ	Guanine nucleotide-binding Protein Gq
GPCR.....	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat

IEG	Immediate Early Genes
MAPK.....	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MM.....	multiple Myelom
mTOR.....	mechanistic Target of Rapamycin
mTORC1.....	mTOR-Komplex 1
mTORC2.....	mTOR-Komplex 2
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAD(P)H	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
ORR.....	objektive Response-Rate
OS	Overall Survival
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDK1	3-Phosphoinositid-abhängige Kinase-1
PDX.....	Patient derived Xenograft
PFS.....	Progressionsfreies Survival
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Proteinkinase-C
PLC β	Phospholipase-C-beta
RBL2.....	retinoblastoma-like 2
RSK	Ribosomale S6-Kinase
RTK	Tyrosinkinase-Rezeptor
SF3B1.....	Splicing-Faktor 3b
TCF.....	Ternary-Complex-Factor-Familie
UCH	Ubiquitin-Carboxy-terminale Hydrolase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XTT.....	Tetrazoliumchlorid

Einführung

1.1 Die Aderhaut

Die Aderhaut (Choroidea) befindet sich in der hinteren Augenhälfte zwischen Sklera und Retina und bildet zusammen mit dem Irisstroma und dem Ziliarkörper die Uvea, auch mittlere Augenhaut oder Tunica vasculosa bulbi genannt. Der Aufbau der Aderhaut besteht aus drei Schichten: der äußeren Suprachoroidea, die Gefäße und Nerven beinhaltet, des mittleren Stratum vasculare und der inneren Choroidocapillaris (Kapillarschicht), in direkter Nachbarschaft zum Pigmentepithel der Retina [1].

Im Stroma der Aderhaut verlaufen Blutgefäße und es ist mit zahlreichen Melanozyten durchsetzt. Die Sinneszellen der Retina und das Pigmentepithel werden über diese Gefäße versorgt [1].

1.2 Das Aderhautmelanom

Das Aderhautmelanom, eine vergleichsweise seltene Tumorerkrankung, ist der häufigste bösartige okuläre Tumor [2]. In Industriestaaten wird das Aderhautmelanom in ungefähr 4-11 Fällen pro Million Einwohner pro Jahr diagnostiziert [3-6], was ungefähr 5% aller Melanomerkrankungen darstellt.

Die Neoplasie entsteht aus Melanozyten, die sich in der Choroidea, dem Ziliarkörper und der Iris befinden [7, 8], folglich aus Melanozyten der Uvea. Diesbezüglich stellt der englische Begriff "uveal melanoma" eine treffendere Bezeichnung für die Erkrankung dar. Zirka 85% der Fälle betreffen den in Bezug zum Augenäquator posterioren Abschnitt der Choroidea, die damit häufigste Lokalisation des Aderhautmelanoms [9]. Der vordere Abschnitt, bestehend aus Iris, Ziliarkörper und vorderer Choroidea, umfasst 9-15% der Fälle [9].

Zytologisch und nach prognostischer Relevanz wird das Aderhautmelanom nach der AFIP-modifizierten Callender-Klassifikation [10] eingeteilt. Läsionen die nur Spindel-A-Zellen nachweisen werden als Spindelzellnävus und damit als benigne eingeteilt. Sie weisen prognostisch den besten Ausgang auf. Tumoren mit Spindel-B-Zellen mit oder ohne Spindel-A-Zellen werden als Spindelzell-Melanome klassifiziert. Gemischtzellige Melanome beinhalten sowohl Spindel-B- als auch Epitheloidzellen. Epitheloidzellhaltige Melanome haben einen Epitheloidzell-Anteil von über 75% und haben die schlechteste Prognose [10]. Diesen Zellen wird eine intrinsische Affinität zur Metastasierung nachgesagt und der Epitheloidzell-Anteil

wird deshalb als entscheidendes Charakteristika der Hochrisikoläsionen gewertet [11, 12]. Zusammen mit den Spindelzell-Melanomen und gemischtzelligen Melanomen werden sie als maligne eingestuft.

Neben der Zellzusammensetzung beeinflusst auch die Lokalisierung des Aderhautmelanoms die Prognose. Melanome der Iris stellen 2-4% der Fälle dar und werden mit einer frühen Diagnose und der besten Prognose in Verbindung gebracht [13]. Tumoren, die im Ziliarkörper lokalisiert sind, werden mit der schlechtesten Prognose assoziiert und stellen 4-7% der Aderhautmelanome dar. Grundsätzlich entwickeln zirka 50% der Patienten langfristig Metastasen. Wenn die Metastasierung eintritt, haben die Betroffenen trotz Behandlung eine mediane Überlebenszeit von vier bis 15 Monaten [14-18].

Das Aderhautmelanom wird weitestgehend als ein spontanes Mutationsereignis angesehen. Es wurden bestimmte Risikofaktoren als prädisponierende Faktoren für die Entwicklung des Melanoms beschrieben, wie beispielsweise Irisfarbe, Hautfarbe, nordeuropäische Abstammung und selten auch positive Familienanamnese [19-23]. Wie Virgili et al. belegten, gibt es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Inzidenz und dem geographischen Breitengrad, mit einer Jahresinzidenz von zirka zwei Fällen pro Million Einwohner in südeuropäischen Ländern im Vergleich zu acht Fällen in nordeuropäischen Ländern [6]. Die Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS) Gruppe gibt weitere Risikofaktoren für Tumorwachstum und eine mögliche Malignität an: eine große initiale Tumordicke und ein großer –durchmesser, das Vorhandensein von orangem Pigment, die Abwesenheit von Drüsen und von tumornah gelegenen retinalen Pigmentepithel [24].

1.3 Metastasierung des Aderhautmelanoms

Das Aderhautmelanom ist ein hochaggressiver Tumor der häufig metastasiert [3]. In ungefähr 90% der Fälle ist die Leber als Ort der Metastasierung betroffen [3, 7, 25]. Kath et al. [26] beschreiben folgende unterschiedliche Lokalisierungen der Fernmetastasen: Leber (87%), Lunge (46%), Knochen (29%) und Haut (17%). Es ist bekannt, dass das Aderhautmelanom über den hämatogenen Weg in entfernte Organe metastasiert, die überwiegende Leberbeteiligung kann allerdings noch nicht ausreichend erklärt werden [27]. Sobald sich Lebermetastasen entwickeln, haben Patienten eine mediane Überlebenszeit von zirka sechs bis neun Monaten [3, 26]. Patienten, die Metastasen ohne Leberbeteiligung entwickeln, haben hingegen eine deutlich höhere Lebenserwartung von durchschnittlich zehn bis 31 Monaten [26].

Die Metastasierung des Aderhautmelanoms ist ein komplexer Mechanismus, der durch ein erhöhtes Potenzial der Tumorzellen in Bezug auf Proliferation, Migration und Invasion zustande kommt [28]. Man vermutet, dass viele Patienten zur Zeit der Diagnose bereits subklinische Mikro-Metastasen [29] haben und diese frühzeitige Metastasierung für die erhöhte Mortalität des Aderhautmelanoms verantwortlich ist [30]. Auch die Größe der Tumoren wird mit höheren Metastasierungsraten und einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht. Eine Metaanalyse, die die Mortalität nach Enukleation unterschiedlich großer Aderhautmelanome vergleicht, zeigt eine geringere Überlebensrate bei großen Tumoren (47%) im Vergleich zu kleinen (84%) und mittelgroßen (68%) Tumoren [31]. In einer Studie von 1776 Patienten konnten Damato und Coupland [32] die prädiktive Wertigkeit des Tumordurchmessers bezüglich des Metastasierungsrisikos und der Mortalität bestätigen. Laut Shields et al. [33] ist diesbezüglich auch die Tumordicke maßgeblich entscheidend: Nach Ergebnissen einer 8033 Patienten umfassenden Studie erhöht sich das Risiko für eine Metastasenentwicklung mit jedem zusätzlichen Millimeter Tumordicke um 5%. Des Weiteren gibt die COMS-Gruppe diffuses Wachstumsmuster und die Anwesenheit von mitotischen Figuren als bekannte Risikofaktoren für Metastasierung an [34].

1.4 Therapie des primären Aderhautmelanoms

Für die Therapie des primären Aderhautmelanoms haben sich drei Verfahren etabliert. Eine Therapiesäule bildet die Enukleation. Die zweite Möglichkeit bieten verschiedene Verfahren der Strahlentherapie. Die Resektion in Verbindung mit Strahlentherapie stellt die dritte etablierte Therapieoption dar [35].

Bei der Enukleation wird das betroffene Auge komplett entfernt und mit einem Implantat ersetzt. In seltenen Fällen kann es zu Infektionen und Hämatomen kommen, die manchmal eine Entfernung des Implantats zur Folge haben können [36].

Häufigste Therapieform ist die Strahlentherapie. Hierbei wird gezielt das Tumorgewebe bestrahlt ohne dabei das betroffene Auge entfernen zu müssen. Bei der Brachytherapie werden kleine Strahlenträger in die Sklera, oberhalb des Tumors, implantiert. Da nur eine Seite der Strahlenträger strahlungsdurchlässig ist, kann gezielt in Richtung Tumorgewebe bestrahlt werden. Hauptsächlich zwei Applikatoren spielen hierbei eine Rolle, Ruthenium [37] und Iod-125 [38].

Zusätzlich wird die Strahlentherapie in Form von stereotaktischer Radiotherapie angewendet. Beim *Cyber Knife* [39] Verfahren handelt es sich um strahlenchirurgische, roboter-assistierte Photonenbestrahlung. Auch das Gamma Knife [40], ein ähnliches, älteres Verfahren, gibt roboter-assistiert Strahlung in Form von Gammastrahlen aus radioaktiven Cobalt-Ionen ab. Mit beiden Verfahren ist im Rahmen einer einzeitigen Intervention eine millimetergenaue Bestrahlung des Tumorgewebes möglich [39, 41].

Eine weitere Anwendung von Strahlentherapie stellt die Protonenbestrahlung [42] dar. Der Tumor wird präoperativ markiert und anschließend von außen in mehreren kurzen Sitzungen bestrahlt. Diese aufwendige Methode, die nur an spezialisierten Zentren durchgeführt werden kann, ist sehr präzise und gibt im prämarkierten Tumorbereich die höchste Strahlendosis ab, ohne das umliegende Gewebe irreversibel zu schädigen.

Bei allen Verfahren der Strahlentherapie kann die Bestrahlung der Netzhaut zu einer Strahlenretinopathie führen und Patienten langfristig eine Katarakt entwickeln. In seltenen Fällen wird der Sehnerv teilweise oder vollständig beschädigt, was Visuseinschränkungen bis hin zur Erblindung als Komplikation haben kann [43, 44].

Eine weitere Therapiemöglichkeit stellt die Resektion [45] des Tumors mit anschließender Bestrahlung dar.

Allen beschriebenen Behandlungsarten ist gemein, dass das metastatische Potenzial nicht wesentlich beeinflusst wird und es trotzdem bei vielen Patienten zu einer Metastasierung kommt [35]. Deshalb ist es essentiell, neben den primären Therapieformen auch systemtherapeutische Behandlungen zu erforschen und zu entwickeln.

1.5 Molekulargenetische Grundlagen des Aderhautmelanoms

Der MAPK/ERK-Signalweg spielt physiologisch eine essenzielle Rolle in der Übertragung extrazellulärer Signalstoffe auf intrazelluläre Prozesse, die eine Vielzahl von Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung und Zellzyklusprogression regulieren. Diese Kaskade kann über mehrere unterschiedliche Rezeptorfamilien aktiviert werden, allen voran via den G-Proteingekoppelten Rezeptor (GPCR) [46]. Bei G-Proteinen handelt es sich um heterotrimerische, membranständige Guanin-Nukleotid-bindende Rezeptorproteine, die Signale von extrazellulären Faktoren an verschiedene intrazelluläre Transduktionswege koppeln und aus drei Untereinheiten aufgebaut sind: alpha, beta und gamma [47]. Wenn die α -Untereinheit an

GTP gebunden ist, ist das G-Protein aktiv, wird hingegen GTP zu GDP hydrolysiert, ist die Aktivität blockiert [48, 49]. Über die membrangebundene **Phospholipase C beta (PLC β)** führt die α -Untereinheit von Gq zur Aktivierung der **Proteinkinase C (PKC)** [50-52] (siehe **Abb. 1**), die weitere Aktivierung findet über Ras oder Raf statt. Die Raf-Kinasen (Raf-1, B-Raf, A-Raf), Komponenten der MAPKKK-Ebene, führen durch Serin-Phosphorylierung [53] zur Aktivierung von **MEK1/2** (MAPKK-Ebene) [54, 55], diese phosphorylieren und aktivieren schließlich ERK1 und ERK2 auf MAPK-Ebene (siehe **Abb. 1**). Ein weiterer Mechanismus der Übertragung von extrazellulären Signalen auf die MAPK/ERK-Kaskade läuft über den **EGF-Rezeptor** und andere Tyrosinkinase-Rezeptoren (RTK) ab [56] (siehe **Abb. 1**).

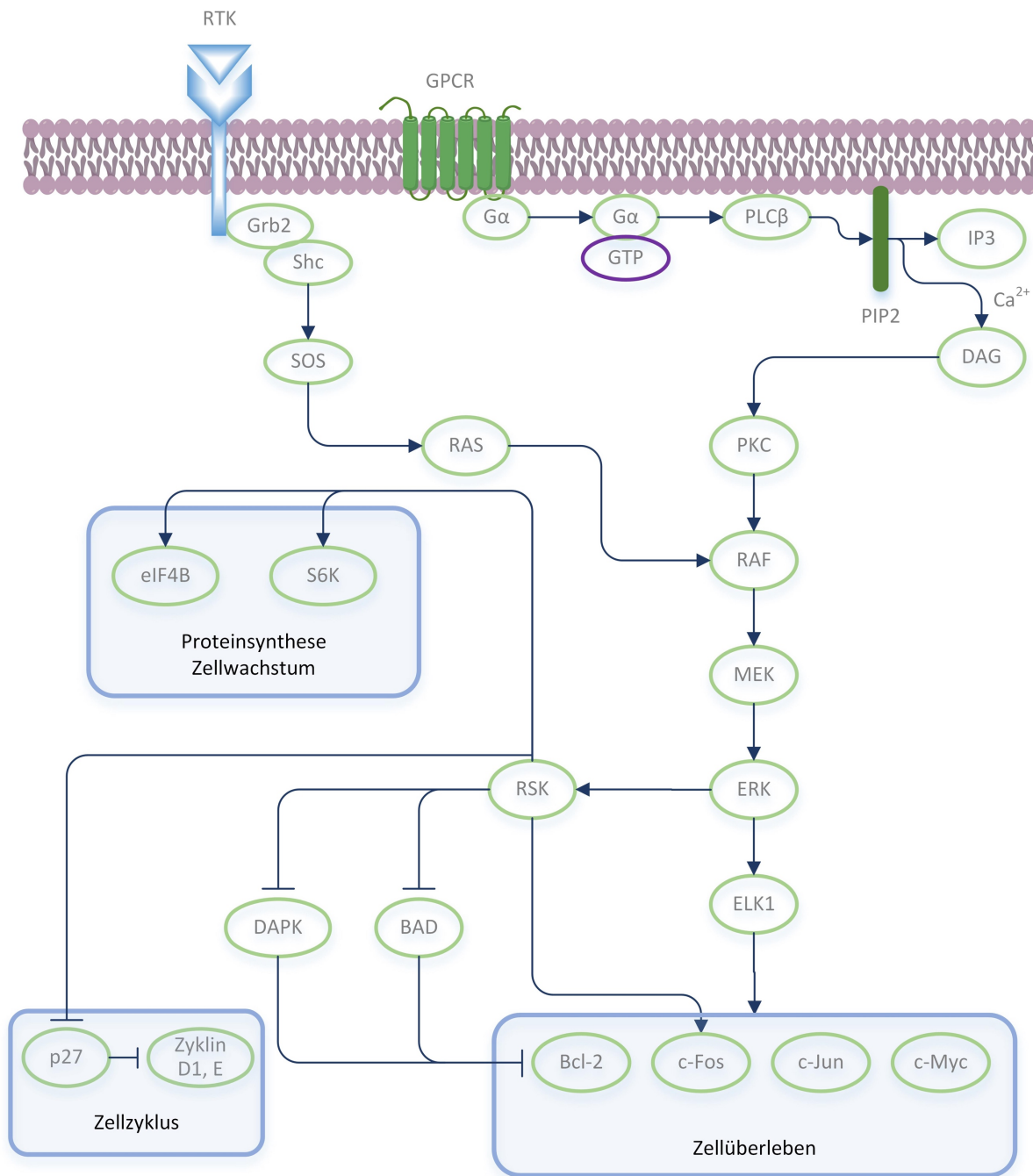


Abbildung 1: Vereinfachte und schematische Darstellung des MAPK/MEK/ERK-Signalweges und seine Wirkung auf die Zellfunktion; angepasst und modifiziert [57-59]; mit Microsoft Visio® erstellt.

ERK1/2 sind Serin/Threonin-Kinasen die sowohl im Zytosol als auch nach Translokation im Nukleus eine Vielzahl von Substraten phosphorylieren [60]. Nukleare Ziele von ERK sind unter anderem die Ternary-Complex-Factor-Familie (TCF) der Transkriptionsfaktoren. Elk1 ist das am detailliertesten erforschte Mitglied dieser Familie [61], es konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von Elk1 durch ERK1/2 zu erhöhter Transkriptionsaktivität führt [27,

62, 63]. Diese Transkriptionsfaktoren spielen eine wesentliche Rolle in der Expressionsinduktion der „Immediate Early Genes“ (IEG) [64]. Die IEG-Produkte wie c-Fos, c-Myc und c-Jun induzieren „late-response genes“ [57, 65], welche Zellüberleben, -teilung und -motilität bewirken [66]. Im Zytosol wirkt ERK unter anderem auf cAMP, Phosphodiesterase (PDE4), zytosolische Phospholipase A2 (cPLA2) [67] und eine Vielzahl von Regulatorproteinen, darunter die sogenannten MAPK-activating-Proteinkinasen (MAPKAPK) [68]. Hierzu gehören die RSK [69], die MAPK/SAPK-activated-Kinase (MSK) [70], MAPK-signal-interacting-kinases 1 und 2 (MNK1,2) [71, 72] und MAPKAPK-3/5 [68]. Über die RSK-Proteinfamilie und andere Regulatorproteine nimmt die MAPK/ERK-Kaskade regulierenden Einfluss auf Zellwachstum, -proliferation, -motilität und -überleben. Dies wird durch die RSK-vermittelte Phosphorylierung mehrerer Transkriptionsfaktoren im Nukleus und im Zytosol durch Inaktivierung verschiedener pro-apoptotischen Proteine bewirkt [73]. Eine Vielzahl von ribosomalen Proteinen wird durch aktivierte RSK-Enzyme phosphoryliert und aktiviert, wodurch die Proteinsynthese gesteigert wird. RSK1/2 fördert zudem die Transition von der G1- zur S-Phase durch Phosphorylierung und Inaktivierung des Zellzyklus-Inhibitoren p27Kip1 [63], der indessen Zyklin-CDK-Komplexe, die essenziell für die Progression des Zellzyklus sind, inhibiert [74].

Ein weiterer Mechanismus, der bezüglich der Kontrolle von Zellfunktionen wie Überleben, Differenzierung, Proliferation und Metabolismus eine essenzielle Rolle spielt, ist der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg (siehe **Abb. 2**). Aktivierte RTK aktivieren Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) der Klasse-Ia durch direkte Bindung an den Rezeptor oder indirekt durch Phosphorylierung von Bindungsproteinen, welche PI3K binden und aktivieren [56, 75]. Über die Gβγ-Untereinheit des GPCR wird Klasse-Ib-PI3K aktiviert [76]. Klasse-I-PI3K phosphoryliert PIP2 zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3), dieses bindet 3-Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (PDK1) und **AKT (Proteinkinase-B)** an der Plasmamembran [56, 77, 78]. PDK1 phosphoryliert die Aktivierungsdomäne von AKT, die hydrophobe Domäne wird von mTOR-Komplex 2 (mTORC2), der ebenfalls RTK- und PI3K-vermittelt über nicht weiter bekannte Signalmechanismen aktiviert wird, phosphoryliert [79]. AKT aktiviert **mTOR-Komplex 1 (mTORC1)** durch die indirekte Inhibierung der negativen Regulatoren [56, 80, 81] (siehe **Abb. 2**).

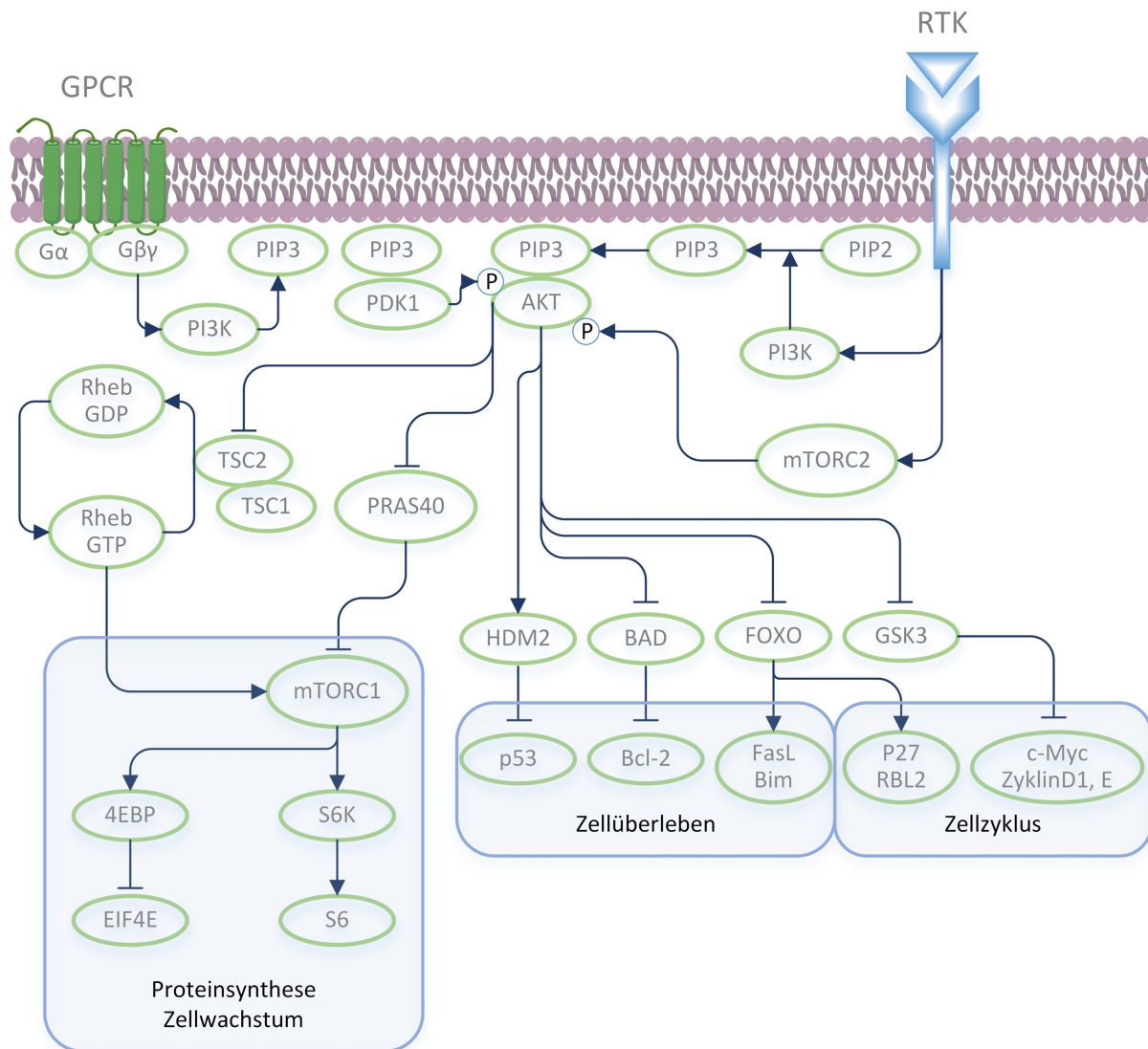


Abbildung 2: Vereinfachte und schematische Darstellung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges und seine Wirkung auf die Zellfunktion; angepasst und modifiziert [80, 82, 83]; mit Microsoft Visio® erstellt.

AKT erhöht die Überlebensfähigkeit von Zellen, indem es durch die Inhibition proapoptotischer Proteine die Einleitung apoptotischer Prozesse verhindert [77, 78] (siehe **Abb. 2**). AKT inhibiert zudem die Expression von Transkriptionsfaktoren wie Forkhead-box-O (FOXO) und p53 und wirkt somit zusätzlich antiapoptotisch [81, 84]. AKT-Aktivierung fördert zudem auch proliferative Signalwege durch nachgeschaltete Ziele, die in die Regulierung des Zellzyklus eingreifen. Ein beschriebener Mechanismus wird durch die Inaktivierung von GSK3 bewerkstelligt: aktiviertes GSK-3 inaktiviert die nuklearen Zykline D1 und E sowie die Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Myc; durch die Inaktivierung von GSK3 wird somit die Progression des Zellzyklus unterstützt [65, 73, 84, 85]. Desweiteren fördert AKT die Transition von der G1- zur S-Phase durch Hemmung der Aktivierung der Zellzyklus-Inhibitoren p27Kip1

und „retinoblastoma-like 2“ (RBL2) [84, 86]. Über mTORC1 wirkt AKT zusätzlich auf die Proteinsynthese und folglich auf das Zellwachstum [56, 77, 78].

1.6 Genetische Mutationen beim Aderhautmelanom

Beim Aderhautmelanom ist die MAPK/ERK-Kaskade von großer Bedeutung, allerdings fehlen hier in den meisten Fällen die für das kutane Melanom charakteristischen Genmutationen [87]. Diesbezüglich konnten mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass beim Aderhautmelanom der MAPK-Signalweg wesentlich aktiviert war, obwohl kaum Mutationen in BRAF [88-90], RAS [89-92] oder KIT [93] nachweisbar waren. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass andere vorgeschaltete Mutationen für die dauerhafte Aktivierung des MAPK-Signalwegs zuständig sein müssen [88, 90, 94].

Die Mechanismen, die zur dauerhaften Aktivierung der MAPK/ERK-Kaskade führen, waren lange Zeit unbekannt, erst die noch nicht lange zurückliegende Entdeckung von Mutationen im GNAQ-Gen in nahezu der Hälfte aller Fälle [95, 96] konnte helfen, viele dieser Unklarheiten zu beseitigen. Kurze Zeit später konnten van Raamsdonk et al. [97] auch Mutationen in GNA11 nachweisen. Zusammen mit GNA14 und GNA15/16 handelt es sich hier um eine „subfamily of G protein α subunit encoding genes“ [98]. GNAQ und GNA11 sind große GTPasen der $G\alpha$ -Untereinheit [96, 97]. Mutationen führen zu einem partiellen oder kompletten Verlust der GTPase-Aktivität, somit zur dauerhaften Bindung der α -Subgruppe des G-Proteins an GTP und folglich zu einer irreversiblen Aktivierung des G-Proteins [48, 49, 99-101]. Die entstehenden dominanten Onkogene führen zur Aktivierung der MAPK/ERK- und PI3K/AKT-Signalkaskaden [102-104]. Insgesamt können GNAQ- und GNA11-Mutationen in zirka 80% der primären Aderhautmelanome nachgewiesen werden [95-97] und spielen folglich eine große Rolle in der Entstehung und Progression des Aderhautmelanoms.

Mutationen in GNAQ und GNA11 sind nicht nur auf maligne okuläre Tumoren beschränkt. Zwischen Mutationen der beiden G-Protein-Untereinheiten ist kein signifikanter Unterschied bezüglich „overall survival“ (OS) [97] und „disease-free survival“ [97] auszumachen. Mutierte GNAQ/11 gelten eher als schwache Onkoproteine, sie verändern Melanozyten hinsichtlich der Aktivität anderer Signalwege wie p53 und p16/CDK4/RB [96]. Diese Erkenntnis, zusammen mit der Tatsache, dass GNAQ/GNA11-Alterationen auch bei benignen Neoplasien auftreten, stützen die Hypothese, dass GNAQ/11-Mutationen früh in der Tumorentstehung auftreten

und für die Tumorgenese notwendig sind [105], allerdings zusätzliche Driver-Mutationen für das Metastasierungspotenzial verantwortlich sind [105].

Kürzlich wurden Alterationen in Splicing-Faktor 3b (SF3B1) und eukaryotischer Translations-Initiierungs-Faktor 1A, X-linked (EIF1AX) nachgewiesen [106, 107]. SF3B1- und EIF1AX-Mutationen sind seltener und kommen gehäuft bei Fällen mit guter Prognose vor [108]. Dementsprechend scheinen diese Mutationen auch nicht für das hohe metastatische Potenzial verantwortlich zu sein. Diesbezüglich hat sich in den letzten Jahren vor allem BAP1 als aussichtsreicher Kandidat hervorgetan. Mutationen in BAP1 lassen sich in zirka 47% der primären Aderhautmelanome und 84% der metastasierten Klasse-II-Aderhautmelanome finden [109, 110]. Die Ubiquitin-Carboxy-terminale Hydrolase (UCH), eine Subklasse verschiedener deubiquitierender Enzyme, wird über BAP1 kodiert [110]. Des Weiteren ist BAP1 Teil eines heterodimeren Komplexes mit Tumorsuppressor-Aktivität [110, 111]. Aderhautmelanome mit deletiertem BAP1 weisen stammzellähnliche Charakteristika auf [112]. Es kann beobachtet werden, dass viele Gene, deren Produkte in Entwicklungsphasen von Stammzellen vermehrt vorkommen, im Falle einer BAP1-Deletion hochreguliert sind. Hingegen sind Gene, die für Differenzierung und Erhalt der Zellidentität verantwortlich sind, herunterreguliert [112, 113]. Man vermutet, dass diese Mutationen erst nach Mutationen in GNAQ/11 entstehen [114], der Verlust der Deubiquitierung verschiedener Proteine im Rahmen der verminderten Aktivität von BAP1 für eine Metastasierung prädisponierend ist und folglich BAP1 für das maligne Potenzial verantwortlich sein kann [109].

1.7 Bisherige Therapie der Metastasierung

Bisher gibt es für Patienten mit metastasiertem Aderhautmelanom keine etablierte Standardtherapie mit zufriedenstellender Wirkung [17, 104, 115, 116]. Ein Chemotherapeutikum, dass beim kutanen Melanom eingesetzt werden kann, Decarbazin, kommt trotz der molekulargenetischen Unterschiede auch beim metastasierten Aderhautmelanom zum Einsatz, mit beschränkter Wirkung [117, 118]. Viele Ansätze mit verschiedenen anderen Chemotherapeutika wie Temozolomid, Treosulfan, Vincristin, Bleomycin, Cisplatin, Fotemustin oder Bendamustin wurden untersucht [119-124], die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten klinischen Nutzen [17, 29, 125].

In den USA und Europa ist zur Therapie von fortgeschrittenen, operativ nicht entfernbaren Melanomen, Ipilimumab, ein monoklonaler Antikörper gegen zytotoxisches T-lymphozyten-assoziiertes Antigen-4 (CTLA-4), zugelassen [118]. Auch hier wurde die Wirkung beim Aderhautmelanom evaluiert [30, 126, 127], mit unzureichendem medianen PFS und OS [127]. Bei Patienten mit isolierten Lebermetastasen kann auf mehrere lokale Therapieoptionen zurückgegriffen werden, um die Läsion komplett zu entfernen, beispielsweise operative Entfernung, Chemoembolisation und intraarterielle Chemotherapie. Da Lebermetastasen in der Regel hypervaskularisiert sind, stellt die lokale Applikation von Chemotherapeutika eine effektive Methode da, mit Ansprechraten bis zu 40% der Patienten [128]. Allerdings konnten im Vergleich zur systemischen Chemotherapie bisher keine Vorteile bezüglich der Überlebensrate erzielt werden [129, 130]. Bei voller Ausschöpfung aller Therapiemöglichkeiten ist das mediane Gesamtüberleben weiterhin limitiert, mit einem Anstieg auf 14-15 Monate [131].

Das metastasierte Aderhautmelanom zeigt eine erhöhte Expression der Rezeptor-Tyrosinkinase c-KIT [114] und auch erhöhte VEGF-Spiegel [132] und so entstand die Rationale, VEGF und seinen Rezeptor therapeutisch anzuvisieren und KIT-Inhibitoren als Therapeutika zu evaluieren. Der Kinaseinhibitor Imatinib zeigte in einer Pilotenstudie von 13 Patienten kaum Aktivität und kein klinisches Ansprechen [133]. Auch Sunitinib wurde in einer Phase-II-Studie von 20 Patienten untersucht [134], es stellte sich keine signifikante Verbesserung der Überlebenszeit dar (medianes Overall-Survival (OS) 8,2 und progressionsfreies Survival (PFS) 4,2 Monaten). Dementsprechend wird c-KIT nicht mehr als Therapieziel für Kinaseinhibitoren verfolgt [114]. Auch VEGF und sein Rezeptor werden von Sunitinib inhibiert, die Ergebnisse von Mahipal et al. [134] sind hier übertragbar. Zudem wurden Sorafenib in Kombination mit Chemotherapie [135] und Aflibercept [136] eingesetzt. In der 24 Patienten Phase-II-Studie Sorafenib plus Carboplatin und Paclitaxel konnte keine objektive Response-Rate (ORR) erzielt werden und die PFS nach 6 Monaten betrug 29%, woraufhin die Studie terminiert wurde. Auch bei Aflibercept konnte keine ORR bei leichter Verbesserung des PFS beobachtet werden.

Durch die Entdeckung der Bedeutung von GNAQ und GNA11 in Bezug auf das Aderhautmelanom und deren Beeinflussung verschiedener Signalwege wie MAPK/ERK und PI3K/AKT, haben sich verschiedene Bestandteile dieser Kaskaden als Therapieansätze hervorgetan, unter anderem MEK, Proteinkinase C [137] und PI3K/AKT/mTOR [78].

1.8 Selumetinib

Selumetinib (AZD6244, ARRY-142886, AstraZeneca) ist ein oraler, hochselektiver Inhibitor von mitogen-aktivierter Proteinkinase MEK1 und MEK2 [138, 139]. Die Wirkung dieses Inhibitors auf Melanome wurde vermehrt überprüft, auch verschiedene andere Tumoren werden bezüglich ihrer Sensibilität gegenüber Selumetinib untersucht, unter anderem das persistierende Endometriumkarzinom (NCT01011933) [140], das multiple Myelom (NCT01085214) [141], die akute myeloische Leukämie (NCT00588809) [142], das metastasierte Kolorektalkarzinom (NCT02188264) [143], das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom Stadium IIIB-IV (NCT02503358) [144] und das metastasierte Schilddrüsenkarzinom (NCT02393690) [145].

1.9 Trametinib

Trametinib (Mekinist, GSK1120212, Novartis) ist ein oraler, selektiver allosterischer MEK-Kinase-1/2-Inhibitor, der in Europa seit 2014 in Kombination mit Dabrafenib für die Behandlung metastasierter oder nicht resezierbarer, BRAF-V600-positiver Melanome zugelassen ist [146]. Trametinib und seine antineoplastische Wirkung werden derzeit vielfach untersucht, unter anderem sind eine Phase-III-Studie bei progressivem low-grade Ovar- oder Peritonealkarzinom (NCT02101788) [147] sowie Phase-II-Studien bezüglich Zervix- (NCT01958112) [148], metastasiertem Schilddrüsen- (NCT02152995) [149], Stage IV KRAS-pos. nicht-kleinzelligem Bronchial- (NCT02642042) [150], metastasiertem Pankreas- (NCT01231581) [151], dreifach-negativem Mamma- (NCT01964924) [152] und Ras/Raf-Wildtyp Kolorektalkarzinom (NCT02399943) [153] aktiv.

1.10 Everolimus

Everolimus (Certican®, Afinitor®, RAD-001, Novartis) ist ein immunsuppressives Analogon des Rapamycins (Sirolimus) und gehört zur Medikamentengruppe der mTOR-Inhibitoren [154]. Seit 2003 ist Everolimus in Kombination mit Ciclosporin in der EU in der Indikation der prophylaktischen Immunsuppressionstherapie nach Herz- und Nierentransplantation zugelassen. Weiterhin wurde Everolimus als Therapeutikum bei fortgeschrittenem Mammakarzinom, nicht-operablem/metastasiertem neuroendokrinen Tumoren (mit Ursprung im Pankreas, GIT oder der Lunge) und als Second-line-Therapie bei fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom zugelassen [155].

1.11 Erlotinib

Erlotinib (Tarceva®, OSI-774, Fa. Roche) ist ein oraler, selektiver Inhibitor der Tyrosinkinase-Domäne des EGF-R [156], zahlreiche Krebszellen exprimieren diesen Rezeptor vermehrt an ihrer Oberfläche [157]. EGF führt zur Phosphorylierung und Aktivierung zahlreicher nachgeschalteter Kaskaden, beispielsweise PI3K/AKT/mTOR, Proteinkinase C und MAPK/ERK [51, 158-160]. Erlotinib ist in Europa für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom (first-line bei lokal fortgeschrittenem/metastasiertem EGFR-positivem Karzinom) [161] seit 2005 und seit 2007 zur Therapie des metastasierten Pankreaskarzinoms (in Kombination mit Gemcitabin) [162] zugelassen.

1.12 Erufosin

Erufosin (ErPC3), auch Erucylphosphohomocholin genannt, ist ein Homologon von Erucylphosphocholin (ErPC3) und gehört zu der Gruppe der Alkylphosphocholine (APC). Dabei handelt es sich um modifizierte Eterlysophospholipide [163, 164], die im Gegensatz zu anderen antitumoralen Wirkstoffen nicht die DNA, sondern die Zellmembran als Angriffspunkt wählen. Im Vergleich zu anderen Alkylphosphocholinen, wie beispielsweise das gut erforschte Perifosin, weist das neuere Erufosin aufgrund seiner leicht modifizierten Struktur bessere pharmakokinetische und –dynamische Eigenschaften auf. Es stellt das erste APC dar, dass aufgrund fehlender Hämolyse intravenös verabreicht werden kann [165], es zeigt keine Knochenmarks- und eine deutlich geringere gastrointestinale Toxizität [166, 167] und ist durch eine größere therapeutische Breite und antineoplastische Aktivität charakterisiert [168]. Die einzelnen Wirkmechanismen der APC sind nur unzureichend bekannt. Eines der am detailliertesten beschriebenen Ziele von Alkylphosphocholinen stellt die Proteinkinase B/AKT dar [168-173]. Man geht davon aus, dass APCs die Phosphorylierung von AKT nicht durch Inhibition vorhergehender Kinasen bewirken, sondern direkt an AKT binden und somit die Translokation zur Plasmamembran und die anschließende AKT-Phosphorylierung verhindern [171]. Es konnte gezeigt werden, dass Alkylphosphocholine Proteinkinase C [174, 175] und Phospholipase C [176, 177], genauer die Assoziation von PLC- β mit GNAQ/GNA11 [178], inhibieren und folglich neben der PI3K/AKT/mTOR-Kaskade auch die Signaltransduktion über MAPK/MEK/ERK [179] negativ beeinflussen.

Zielsetzung

Trotz großer Bemühungen im Bereich der Forschung gibt es weiterhin keine zufriedenstellende Therapie für Patienten mit metastasiertem Aderhautmelanom. Große Hoffnung beruht auf spezifischen Inhibitoren, die innerhalb der MAPK/MEK/ERK- und PI3K/AKT/mTOR-Signalwege ihrer Funktion nachgehen, da diese Signalwege essenziell für die Entstehung des Aderhautmelanoms sind. Bisherige klinische Studien konnten aber nur eine geringe Verbesserung des progressionsfreien- und Gesamtüberlebens erzielen. Ziel dieser Arbeit ist es, Wirkstoffe, die in dieser Indikation schon mehrfach angewandt wurden, zu untersuchen und anhand von in-vitro Versuchen die beschriebenen Resultate zu bestätigen. Weiterhin werden im Rahmen dieser Arbeit soweit bekannt erstmalig zwei weitere Wirkstoffe an Zellen des Aderhautmelanoms untersucht und deren Effekt im Vergleich zu den anderen Wirkstoffen analysiert.

Um für diese Zielsetzung sinnvolle Rahmenbedingungen zu gestalten, ist es ausschlaggebend, eine passende Auswahl an Wirkstoffen als Repräsentanten für die bereits untersuchten Wirkstoffe zu treffen. MEK ist ein essenzieller Baustein innerhalb der MAPK/MEK/ERK-Kaskade und stellt ein aussichtsreiches Target für eine Inhibitionstherapie dar. Es steht hierfür eine Vielzahl von Inhibitoren zur Verfügung, Selumetinib und Trametinib wurden aufgrund zahlreicher Studien für diese Arbeit gewählt. PI3K/AKT/mTOR stellt die andere wichtige Achse in der Entwicklung des Tumors dar. Hier bietet sich ebenfalls eine Vielzahl an Kinasen an, die für eine spezifische Inhibition in Frage kommen. Speziell mTORC1 wird in der Theorie eine wesentliche Rolle als Effektor dieses Signalwegs zugeschrieben und kann spezifisch durch Everolimus gehemmt werden. Einen der beiden neu zu untersuchenden Wirkstoffe stellt Erlotinib dar. Erlotinib ist ein altbekannter Inhibitor des EGF-Rezeptors. EGFR ist eine Unterform der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und vermittelt die Transmittierung zahlreicher extrazellulärer Signale in das Innere der Zelle. Hier wirkt EGFR auf die Signalwege MAPK/MEK/ERK und PI3K/AKT/mTOR. Beim Aderhautmelanom werden diese Signalwege jedoch primär über GPCR stimuliert und Erlotinib dürfte deshalb keine wesentliche Auswirkung auf die Funktion der Aderhautmelanomzellen ausüben. Es wurde folglich als eine Art „negative Kontrolltherapie“ gewählt. Letzter Bestandteil unseres Inventars an Wirkstoffen ist das Alkylphosphocholin Erufosin. Erufosin und andere Alkylphosphocholine konnten in bisherigen, zahlenmäßig eher überschaubaren, Versuchen signifikante antitumorale Wirkung in-vitro aufweisen. Erufosin

wird eine Inhibierende Wirkung auf AKT, PKC und Phospholipase-C β zugeschrieben, seine Verwendung hat folglich eine Inhibition beider Signalwege zur Folge (siehe **Abb. 3**).

Weiterhin ist es wichtig, die richtigen Zellen für diesen Versuchsaufbau zu wählen. In dieser Arbeit wurde auf drei wesentliche Eigenschaften der Zellreihen geachtet. Die Zellen müssen GNAQ- oder GNA11-Mutationen aufweisen, da diese charakteristisch sind. Die Q209L-Mutationsvariante wird bevorzugt, da sie deutlich häufiger ist und R183C im Vergleich eine reduzierte Potenz aufweist [97, 180]. Die Zellen sollen außerdem ihren Ursprung in Metastasen haben, da die Metastasierung die lebensbedrohliche Charakteristik des Aderhautmelanoms bestimmt.

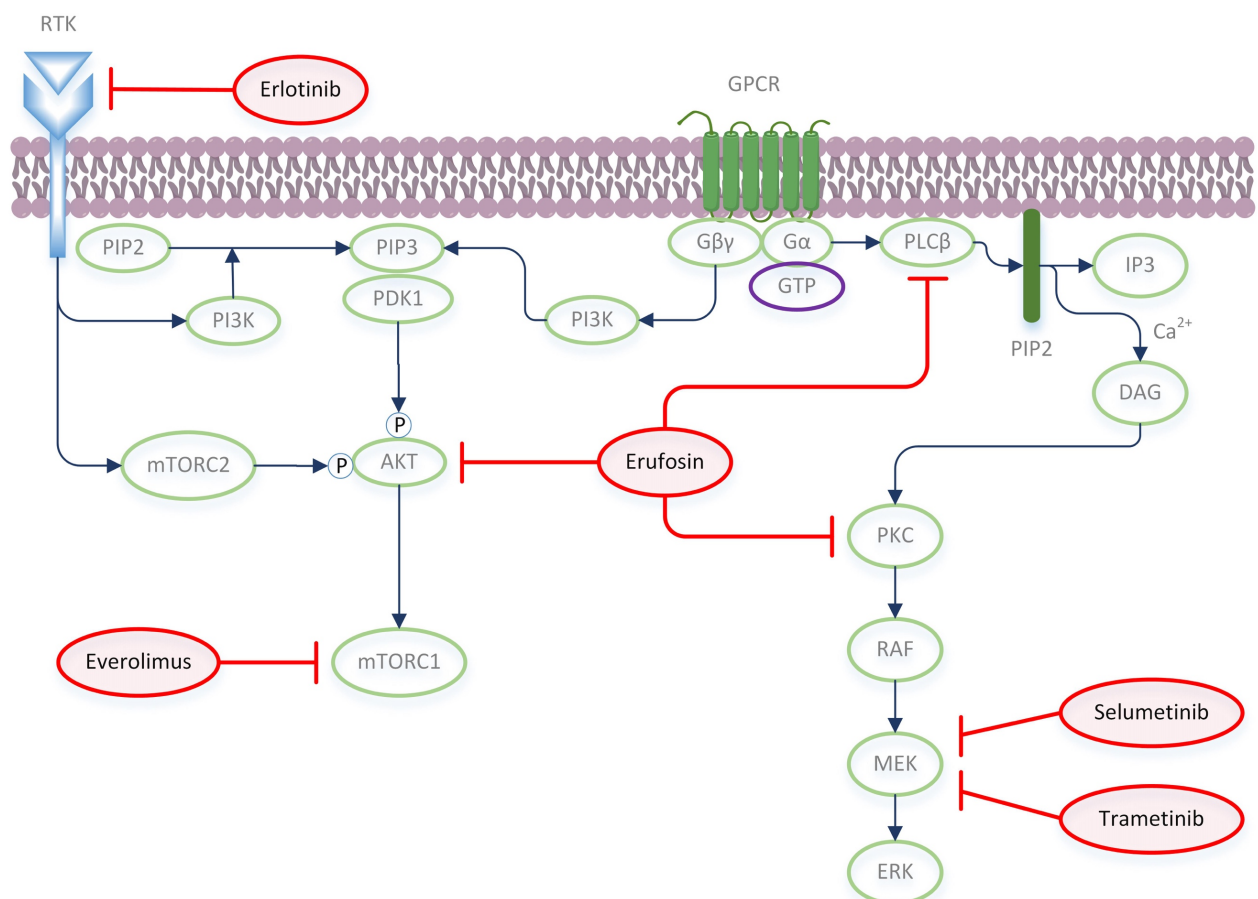


Abbildung 3: Vereinfachte und schematische Darstellung des Einflusses der verschiedenen Inhibitoren auf die MAPK/MEK/ERK- und PI3K/AKT/mTOR-Signalwege; Abb. 1 und Abb. 2 modifiziert und zusammengefügt; mit Microsoft Visio® erstellt.

Material und Methoden

1.13 Rahmenbedingungen, Methoden der Zellkultur, Zelllinien, Pharmaka

Für die folgenden Untersuchungen wurden gezielt Aderhautmelanom-Metastasen-Zelllinien verwendet. Die Zellreihen OMM2.3 und OMM2.5 sind Lebermetastasen und weisen beide eine Q209P GNAQ Mutation auf, OMM1 hat eine subkutane Metastase als Ursprung und ist in Q209L in GNA11 mutiert. Die Zellreihen wurden von Frau Dr. Martine Jager (Ophthalmologisches Laborinstitut, Leiden Universität, Niederlande) im kryokonservierten Zustand übersendet (siehe **Tab. 1**).

Zelllinie	OMM2.5	OMM2.3	OMM1
Mutation	GNAQ Q209P (626 A>C)	GNAQ Q209P (626 A>C)	GNA11 Q209L (626 A>T)
Metastase	Leber	Leber	Subkutis

Tabelle 1: Die Tabelle fasst die Eigenschaften und Bezugsquelle der benutzten Zellreihen zusammen.

Für die Zellkultur aller Zellreihen wurde RPMI 1640 Medium in der ATCC Modifikation mit 3mM L-Glutamin von Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) verwendet und mit Penicillin (50IU/ml)/Streptomycin (50µg/ml) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und 10% Fötalem Bovinem Serum (FBS) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) versetzt. Zum Auftauen der Zellen wurden die kryokonservierten Suspensionen in einem Wasserbad (37°C) erhitzt, kurz vor vollständigem Auftauen mit 9ml des oben beschriebenen Mediums zusammengefügt und bei 3020 U/min für vier Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgeschüttet um das Zellpellet zu erhalten. Dieses wurde mit 5ml Medium resuspendiert und in eine kleine 25ml Kulturflasche transferiert. Nachdem vollständige Konfluenz erreicht war, wurden die Zellen mithilfe von 0,05% Trypsin-EDTA von Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) von der Flasche gelöst und mit 12ml Medium in eine große 75ml Kulturflasche umgefüllt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in nicht-beschichtetem Zellkulturplastik (NUNC, Langenselbold, Deutschland) und unter Standardbedingungen (37°C und mit 5% CO₂ angereicherter Luft). Bei einer Konfluenz von 70-80% wurde die Subkultivierung eingeleitet (in der Regel im Verhältnis 1:3), das Medium wurde abgesaugt und

die Flasche mit 5ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Zum Passagieren der Zellen wurden 2ml 0.05% Trypsin-EDTA den Zellen zugefügt und die Kulturflasche zirka 10 Minuten horizontal im Inkubationsschrank gelagert. Anschließend wurde die Kulturflasche mit 5ml Medium gespült und die Suspension bei 3020U/min für vier Minuten zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgekippt und das Pellet mit 6ml Medium mehrfach resuspendiert. Je 2ml der Suspension wurden mit 10ml Medium in eine neue Kulturflasche transferiert und bei Standardbedingungen inkubiert. Regelmäßig wurden die Zellen lichtmikroskopisch (Leica, Solms, Deutschland) auf ihre Viabilität, zelluläre Integrität und Verunreinigungen untersucht.

Erlotinib, Selumetinib, Trametinib und Everolimus wurden von LC Laboratories (Woburn, Massachusetts, USA) erworben. 100% Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma, St Louis, Missouri, USA) wurde als Lösungsmittel verwendet und die Wirkstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen der Zellkultur hinzugefügt. Erufosin wurden von Prof. Hans-Joerg Eibl (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Deutschland) synthetisiert und zur Verfügung gestellt (siehe **Tab. 2**). Der Wirkstoff wurde in PBS gelöst und der Zellkultur in mehreren Konzentrationen zugefügt. Für alle untersuchten Wirkstoffe wurde als höchste maximale Konzentration die Konzentration gewählt, bei der noch keine Kristalle in der Zellkultur ausfallen.

Wirkstoff		Bezugsquelle
Erlotinib-Hydrochlorid	EGFR -Inhibitor	LC Laboratories
Selumetinib, >99%	MEK1/2 - Inhibitor	LC Laboratories
Trametinib, >99%	MEK1/2 - Inhibitor	LC Laboratories
Everolimus, >99%	mTOR - Inhibitor	LC Laboratories
Erufosin (ErPC3, Erucylphosphohomocholin)	Alkyl-phospho-cholin	Max-Planck-Institut Göttingen

Tabelle 2: Die Tabelle zeigt die untersuchten Wirkstoffe, ihre Eigenschaften und Bezugsquelle.

1.14 Bestimmung der Zellviabilität von OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen unter Erlotinib, Selumetinib, Trametinib, Everolimus und Erufosin mithilfe der Absorptionsmessung im XTT-Assay

Zur Bestimmung der Zellviabilität von OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen unter verschiedenen Konzentrationen von Erlotinib, Selumetinib, Trametinib, Everolimus und Erufosin wurde ein XTT-Assay mit geringfügigen Änderungen zur Anpassung an die ophthalmologische Zellkultur [181] durchgeführt. Der XTT-Assay ist ein kolorimetrischer Assay zur nicht-radioaktiven Quantifizierung der zellulären Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität. Das Tetrazolium-Salz XTT wird durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase und zelluläres NAD(P)H zu Formazan umgesetzt. Diese Bio reduktion findet nur in lebenden Zellen statt [182]. Im Gegensatz zum weitverbreiteten MTT-Assay ist das XTT-Salz wasserlöslich und folglich keine Solubilisierung notwendig [183]. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass sich kolorimetrische Tests wie der XTT-Assay gut für die Darstellung von Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität eignen und eine Korrelation zwischen Anzahl an metabolisch aktiven Zellen und der gemessenen Absorption besteht [182].

Nach Subkultivierung wurden die Zellen in Medium mit Wachstumsfaktoren (in Form von 10% fetalem Kalbsserum) gelöst, in einer 12-Well-Platte (Nunc, Langenselbold, Deutschland) kultiviert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Sobald die Zellen konfluent waren und eine vollständige Adhäsion erreicht haben, wurde das Medium (mit 10% FBS) entfernt und durch serumfreies Medium ersetzt, um eine weitere Proliferation der Zellen zu verhindern. Die Zellen wurden für weitere 24 Stunden mit dem serumfreien Medium inkubiert und anschließend die unterschiedlichen Konzentrationen von Erlotinib (25nM bis 100µM), Selumetinib (1nM bis 200µM), Trametinib (10pM bis 50µM), Everolimus (100fM bis 100µM) und Erufosin (10nM bis 199µM) hinzugefügt, zwei Wells ohne Wirkstoff wurden pro Platte als Kontrolle benutzt. Jeder Versuchsgruppe wurde die gleiche Menge Lösungsmittel (5µl DMSO pro Well bei Erlotinib, Selumetinib, Trametinib und Everolimus; 10µl PBS pro Well bei Erufosin) hinzugefügt. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen unter Standard-Zellkulturbedingungen (37°C und 5% CO₂) wurden 350µl XTT-Testsubstanz (12,5mg von 1mg/ml XTT in 50ml 199 Medium) und 10µl XTT-Aktivator-Substanz (5mM PMS) jedem der 12 Wells der Platte hinzugefügt und nochmals für eine Stunde inkubiert. Nach Übertragung der Lösungen auf eine 96-Well-Platte wurde mithilfe eines Microplate-Readers die Absorption bei 450nm bestimmt.

1.15 Untersuchung der Zellviabilität von OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen unter Erlotinib, Selumetinib, Trametinib, Everolimus und Erufosin mithilfe des Double-stain-apoptosis-detection-Farbstoff-Ausschlusstest

Um bei den Ergebnissen der Zellviabilitätstestung im XTT-Assay apoptotische oder metabolische Ereignisse vom Zelltod durch Nekrose abgrenzen zu können, wurde zusätzlich eine Double-stain-apoptosis-detection-Farbstoff-Ausschlusstest (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) durchgeführt. Hoechst 33345, ein blau-fluoreszierender Farbstoff ist membrangängig und färbt somit die DNA aller Zellen [184]. Hingegen der rot-fluoreszierende Farbstoff Propidiumiodid, ist nicht membrangängig und färbt folglich nur die DNA von toten Zellen, die im Rahmen einer Nekrose ihre Membranintegrität verloren haben [184]. Die Zellen der Zellreihen OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 wurden analog zur Zellviabilitätstestung im XTT-Assay mithilfe von Mikroskop-Objektträgern mit vier Kulturkammern (4-Chamber-Slides, Nunc, Langenselbold, Deutschland) für den Test angesetzt. Die Zellen einer Kammer wurden als Kontrolle nur mit PBS ohne Wirkstoff kultiviert. Die anderen drei Kammern wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Wirkstoffe behandelt (bei Erlotinib wurden die Konzentrationen 25µM, 50µM und 100µM getestet; bei Selumetinib 1µM, 10µM und 100µM; bei Trametinib 10nM, 100nM und 50µM; bei Everolimus 1µM, 10µM und 100µM und bei Erufosin 10µM, 25µM und 100µM). Nach Vorbehandlung und 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit 2µg/ml Propidiumiodid und 1µg/ml Hoechst 33345 in PBS gefärbt. Nach 15 Minuten wurde der Farbstoff mit PBS abgewaschen und die Zellen auf dem Objektträger fixiert. Anhand eines Fluoreszenzmikroskops wurden pro Kammer und Farbstoff fünf Digitalfotos gespeichert und die lebenden blau-fluoreszierenden und nekrotischen rot-fluoreszierenden Zellen manuell gezählt. Dieser Versuch wurde für die Zellreihen OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 für jeden Wirkstoff unabhängig voneinander an insgesamt vier verschiedenen Tagen wiederholt.

1.16 Bestimmung der antiproliferativen Wirkung der Pharmaka an OMM2.5, OMM2.3 und

OMM1 Zellen mithilfe der Absorptionsmessung im XTT-Assay

Um die Wirksamkeit von Erlotinib, Selumetinib, Trametinib, Everolimus und Alkylphosphocholin auf die Proliferation von OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen zu untersuchen, wurde analog zur Bestimmung der Zellviabilität ein XTT-Assay mit geringfügigen Änderungen zur Anpassung an die ophthalmologische Zellkultur [181] durchgeführt und die IC_{50} gemäß der Definition der „International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification [185]“ mit Hilfe einer logarithmischen Regression bestimmt. Auf die folgenden Versuche leicht angepasst, ist die IC_{50} „die Konzentration (mol/l),

bei der die Werte für die optische Dichte im XTT-Assay genau zwischen dem Ausgangswert und der maximalen Reduktion liegen, ohne zytotoxisch zu sein. Die Zellen wurden nach der Zellpassage in Medium mit Wachstumsfaktoren (10% FBS) in einer 12-Well-Platte (Nunc, Langenselbold, Deutschland) kultiviert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen nicht konfluent waren. Nach vier Stunden wurde die Zellkultur in zehn der zwölf Wells mit unterschiedlichen Konzentrationen Erlotinib (von 25nM bis 100µM), Selumetinib (von 10pM bis 500nM), Trametinib (von 10pM bis 5µM), Everolimus (von 10fM bis 10µM) oder Erufosin (von 10nM bis 25µM) inkubiert, zwei Wells fungierten als Kontrolle ohne Wirkstoffzugabe. Jedes Well beinhaltete die gleiche Menge Lösungsmittel (5µl DMSO pro Well bei Erlotinib, Selumetinib, Trametinib und Everolimus; 10µl PBS pro Well bei Erufosin). Nach 72-stündiger Inkubation wurden 350µl XTT-Testsubstanz (12,5mg von 1mg/ml XTT in 50ml 199 Medium) und 10µl XTT-Aktivator-Substanz (5mM PMS) auf jedes der 12 Well der Platte pipettiert und für eine weitere Stunde im Brutschrank inkubiert. Die Lösungen wurden auf eine 96-Well-Platte übertragen und mithilfe eines Microplate-Readers die optische Dichte bei 450nm bestimmt. Die Werte wurden jeweils zweifach bestimmt und der Versuch an vier unterschiedlichen Tagen wiederholt.

1.17 Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen wurden mit Prism 7 durchgeführt. Ein nicht-parametrischer, einfaktorieller ANOVA mit nicht-korrigiertem Fisher's LSD post hoc Test wurde für den statistischen Vergleich zwischen mehreren Gruppen angewandt. Die Ergebnisse galten als statistisch signifikant, wenn $p < 0,05$ mit einem Konfidenzintervall von 95% betrug. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mithilfe von Microsoft EXCEL, die Daten wurden gegen den Mittelwert der Kontrolle normalisiert. Fehler wurden in Form der Standardabweichung dargestellt. Graphisch wurden Konzentrationen, die signifikante Unterschiede zur Kontrolle aufwiesen, mit den Zeichen *, † und ‡ markiert. GNU General Public Licensed Software QtiPlot 0.9.8.9 wurde benutzt, um gemäß den Leitlinien für eine genaue Schätzung der EC_{50}/IC_{50} [186] für Erlotinib, Selumetinib, Trametinib und Everolimus die logarithmischen Kurvenregressionen darzustellen und IC_{50} -Werte zu berechnen.

Ergebnisse

1.18 Proliferation von OMM2.3, OMM2.5 und OMM1 Zellen und IC₅₀-Bestimmung von Erlotinib, Selumetinib, Trametinib, Everolimus und Erufosin

Erlotinib

Zur Bestimmung des Effekts der Pharmaka auf die Proliferation und zum Vergleich der verschiedenen Zellreihen wurde die IC₅₀ aller Pharmaka nach oben genannter Definition bestimmt. Die genaue IC₅₀ wurde anhand einer logarithmischen Regression geschätzt und entspricht für Erlotinib zirka $3,83\mu\text{M} \pm 4,35\mu\text{M SD}$ ($R^2 = 0,81$) in OMM2.5; $4,51\mu\text{M} \pm 0,87\mu\text{M SD}$ ($R^2 = 0,88$) in OMM2.3 und $7,11\mu\text{M} \pm 2,78\mu\text{M SD}$ ($R^2 = 0,82$) in OMM1 (siehe **Abb. 4**).

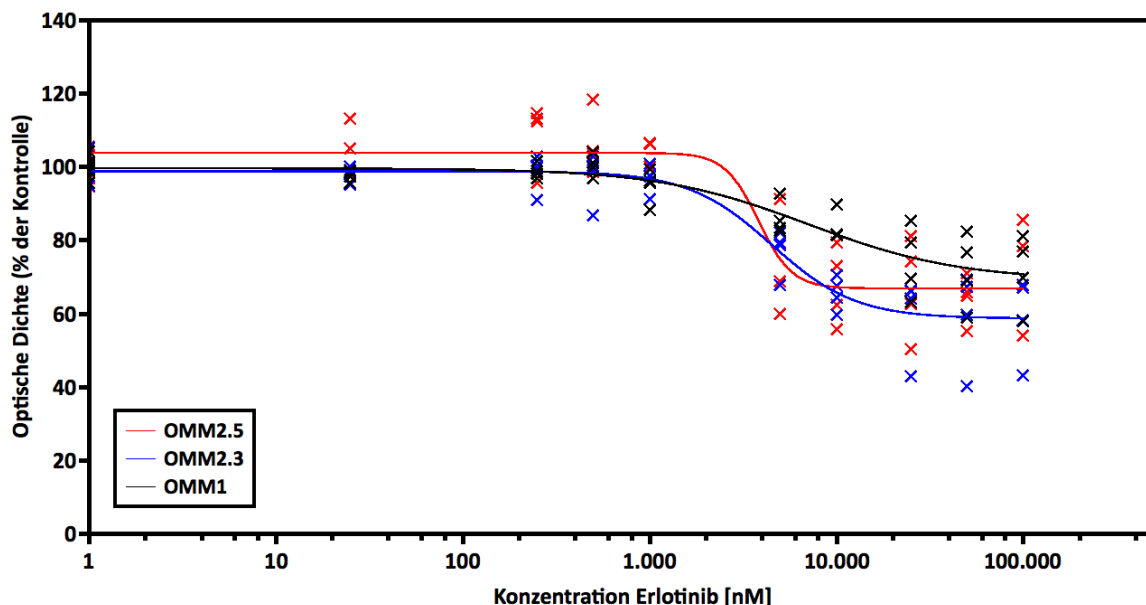


Abbildung 4: Darstellung der Wirkung verschiedener Konzentrationen von Erlotinib auf die Zellproliferation an nicht-konfluenten OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen nach 72h Inkubationszeit. Die optische Dichte im XTT-Test drückt die Anzahl der Zellen aus. Die Abbildung zeigt eine logarithmische Regression (Dosis-Wirkungs-Kurve von Erlotinib auf Proliferation der OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen). Mittels der Ergebnisse der Regression wurde die IC₅₀ bestimmt für OMM2.5 ($3,83\mu\text{M} \pm 4,35\mu\text{M SD}$) ($R^2 = 0,81$), OMM2.3 ($4,51\mu\text{M} \pm 0,87\mu\text{M SD}$) ($R^2 = 0,88$) und OMM1 ($7,11\mu\text{M} \pm 2,78\mu\text{M SD}$) ($R^2 = 0,82$).

Die Proliferation der Zellreihen OMM2.3 und OMM1 wurde durch Erlotinib zwischen 10 μM und 100 μM im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Erlotinib signifikant ($p < 0,05$) reduziert, bei OMM2.5 zeigte Erlotinib zwischen 5 μM und 100 μM eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Erlotinib. (OMM2.5: Ko – 25nM, $p = 0,8261$; Ko – 250nM, $p = 0,3675$;

Ko – 500nM, $p = 0,5462$; Ko – 1 μ M, $p = 0,6538$; Ko – 5 μ M, $p = 0,0095$; Ko – 10 μ M, $p = 0,0014$; Ko – 25 μ M, $p = 0,0012$; Ko – 50 μ M, $p < 0,001$; Ko – 100 μ M, $p = 0,0016$) (OMM2.3: Ko – 25nm, $p = 0,8306$; Ko – 250nM, $p = 0,9115$; Ko – 500nM, $p = 0,8259$; Ko – 1 μ M, $p = 0,9753$; Ko – 5 μ M, $p = 0,0564$; Ko – 10 μ M, $p = 0,0061$; Ko – 25 μ M, $p = 0,0016$; Ko – 50 μ M, $p = 0,0015$; Ko – 100 μ M, $p = 0,0015$) (OMM1: Ko – 25nm, $p = 0,7806$; Ko – 250nM, $p = 0,9015$; Ko – 500nM, $p = 0,9728$; Ko – 1 μ M, $p = 0,4899$; Ko – 5 μ M, $p = 0,0877$; Ko – 10 μ M, $p = 0,0462$; Ko – 25 μ M, $p = 0,0033$; Ko – 50 μ M, $p = 0,0014$; Ko – 100 μ M, $p = 0,0013$).

Selumetinib

Die IC_{50} von Selumetinib wurde anhand einer logarithmischen Regression geschätzt und entspricht zirka $5,014nM \pm 2,04nM$ SD ($R^2 = 0,90$) in OMM2.5; $2,00nM \pm 0,77nM$ SD ($R^2 = 0,86$) in OMM2.3 und $1,52nM \pm 0,60nM$ SD ($R^2 = 0,92$) in OMM1 (siehe **Abb. 5**).

Die Proliferation der Zellreihen OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 wurde durch Selumetinib zwischen 1nM und 500nM im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Selumetinib signifikant ($p < 0,05$) reduziert. Alle Zellreihen zeigen eine identische Reduktion der Proliferation und weisen keine signifikanten Unterschiede untereinander auf. (OMM2.5: Ko – 10pm, $p = 0,5693$; Ko – 50pM, $p = 0,8857$; Ko – 100pM, $p = 0,7607$; Ko – 500pM, $p = 0,2787$; Ko – 1nM, $p = 0,0057$; Ko – 5nM, $p < 0,001$; Ko – 10nM, $p < 0,001$; Ko – 50 μ M, $p < 0,001$; Ko – 100 μ M, $p < 0,001$; Ko – 500nM, $p < 0,001$) (OMM2.3: Ko – 10pm, $p = 0,8287$; Ko – 50pM, $p = 0,7821$; Ko – 100pM, $p = 0,6204$; Ko – 500pM, $p = 0,1471$; Ko – 1nM, $p < 0,001$; Ko – 5nM, $p < 0,001$; Ko – 10nM, $p < 0,001$; Ko – 50 μ M, $p < 0,001$; Ko – 100 μ M, $p < 0,001$; Ko – 500nM, $p < 0,001$) (OMM1: Ko – 10pm, $p = 0,8905$; Ko – 50pM, $p = 0,7515$; Ko – 100pM, $p = 0,3765$; Ko – 500pM, $p = 0,2345$; Ko – 1nM, $p = 0,0339$; Ko – 5nM, $p = 0,0088$; Ko – 10nM, $p = 0,0020$; Ko – 50 μ M, $p < 0,001$; Ko – 100 μ M, $p < 0,001$; Ko – 500nM, $p < 0,001$).

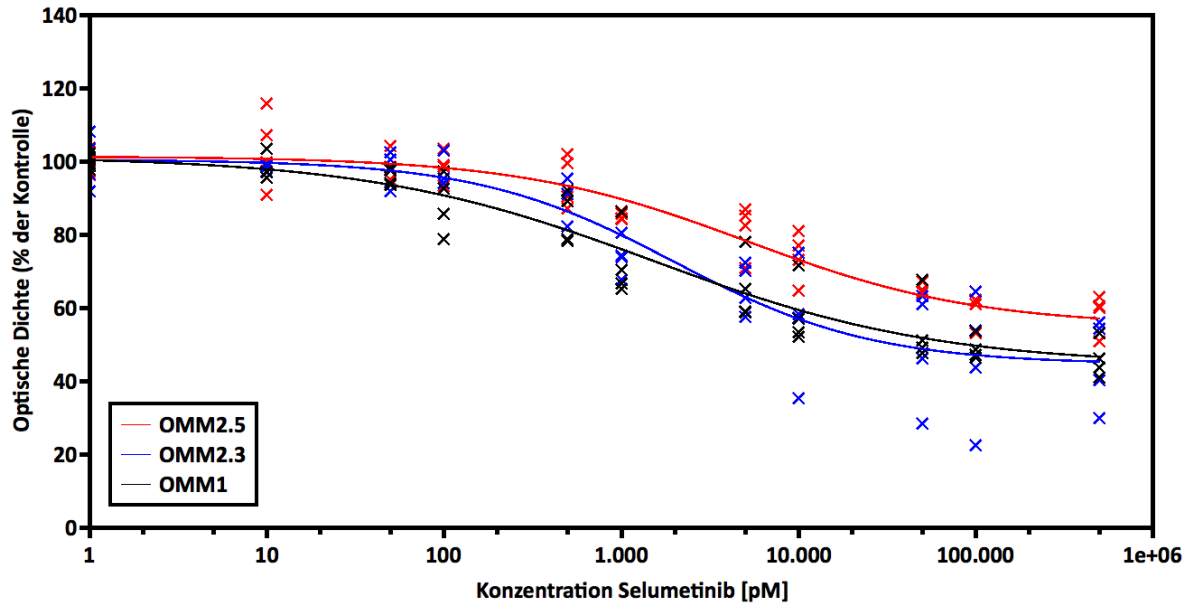


Abbildung 5: Darstellung der Wirkung verschiedener Konzentrationen von Selumetinib auf die Zellproliferation an nicht-konfluenten OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen nach 72h Inkubationszeit. Die optische Dichte im XTT-Test drückt die Anzahl der Zellen aus. Die Abbildung zeigt eine logarithmische Regression (Dosis-Wirkungs-Kurve von Selumetinib auf Proliferation der OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen). Mittels der Ergebnisse der Regression wurde die IC_{50} bestimmt für OMM2.5 ($5,14nM \pm 2,04nM$ SD) ($R^2 = 0,90$), OMM2.3 ($2,00nM \pm 0,77nM$ SD) ($R^2 = 0,86$) und OMM1 ($1,52nM \pm 0,60nM$ SD) ($R^2 = 0,92$).

Trametinib

Die IC_{50} von Trametinib wurde anhand einer logarithmischen Regression geschätzt und entspricht zirka $1,11nM \pm 0,27nM$ SD ($R^2 = 0,93$) in OMM2.5; $2,30nM \pm 0,65nM$ SD ($R^2 = 0,92$) in OMM2.3 und $2,27nM \pm 0,44nM$ SD ($R^2 = 0,97$) in OMM1 (siehe **Abb. 6**).

Die Proliferation der Zellreihen OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 wurde durch Trametinib zwischen 1nM und 5µM im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Trametinib signifikant ($p < 0,05$) reduziert. Alle Zellreihen zeigen eine identische Reduktion der Proliferation und weisen keine signifikanten Unterschiede untereinander auf. (OMM2.5: Ko – 10pm, $p = 0,9928$; Ko – 50pM, $p = 0,7918$; Ko – 100pM, $p = 0,2728$; Ko – 500pM, $p = 0,0597$; Ko – 1nM, $p = 0,0023$; Ko – 5nM, $p < 0,001$; Ko – 10nM, $p < 0,001$; Ko – 100nM, $p < 0,001$; Ko – 1µM, $p < 0,001$; Ko – 5µM, $p < 0,001$) (OMM2.3: Ko – 10pm, $p = 0,9604$; Ko – 50pM, $p = 0,8050$; Ko – 100pM, $p = 0,8186$; Ko – 500pM, $p = 0,7619$; Ko – 1nM, $p = 0,0422$; Ko – 5nM, $p = 0,0087$; Ko – 10nM, $p = 0,0056$; Ko – 100nM, $p < 0,001$; Ko – 1µM, $p < 0,001$; Ko – 5µM, $p < 0,001$) (OMM1: Ko – 10pm, $p = 0,9419$; Ko – 50pM, $p = 0,7575$; Ko – 100pM, $p = 0,0856$; Ko – 500pM, $p = 0,0629$; Ko – 1nM, $p < 0,001$; Ko – 5nM, $p < 0,001$; Ko – 10nM, $p < 0,001$; Ko – 100nM, $p < 0,001$; Ko – 1µM, $p < 0,001$; Ko – 5µM, $p < 0,001$).

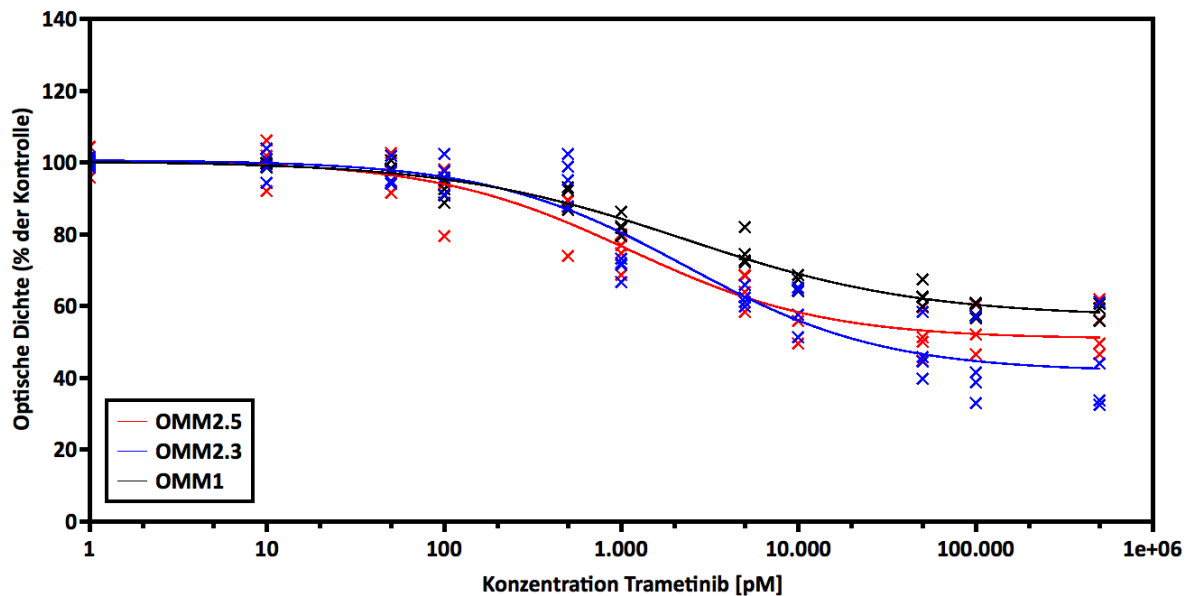


Abbildung 6: Darstellung der Wirkung verschiedener Konzentrationen von Trametinib auf die Zellproliferation an nicht-konfluenten OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen nach 72h. Die optische Dichte im XTT-Test drückt die Anzahl der Zellen aus. Die Abbildung zeigt eine logarithmische Regression (Dosis-Wirkungs-Kurve von Trametinib auf Proliferation der OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen). Mittels der Ergebnisse der Regression wurde die IC_{50} bestimmt für OMM2.5 ($1,11nM \pm 0,27nM$ SD) ($R^2 = 0,93$), OMM2.3 ($2,30nM \pm 0,65nM$ SD) ($R^2 = 0,92$) und OMM1 ($2,27nM \pm 0,44nM$ SD) ($R^2 = 0,97$).

Everolimus

Die IC_{50} von Everolimus wurde anhand einer logarithmischen Regression geschätzt und entspricht zirka $4,09nM \pm 1,39nM$ SD ($R^2 = 0,90$) in OMM2.5; $2,22nM \pm 1,12nM$ SD ($R^2 = 0,87$) in OMM2.3 und $0,68nM \pm 0,54nM$ SD ($R^2 = 0,83$) in OMM1 (siehe **Abb. 7**).

Die Proliferation der Zellreihen OMM2.5 und OMM1 wurde durch Everolimus zwischen 10nM und 10µM im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Everolimus signifikant ($p < 0,05$) reduziert, bei OMM2.3 zeigte Everolimus zwischen 1nM und 10µM eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Everolimus. (OMM2.5: Ko – 10fM, $p = 0,8757$; Ko – 100fM, $p = 0,8902$; Ko – 1pM, $p = 0,9988$; Ko – 10pM, $p = 0,9726$; Ko – 100pM, $p = 0,5517$; Ko – 1nM, $p = 0,7278$; Ko – 10nM, $p = 0,0059$; Ko – 100nM, $p = 0,0019$; Ko – 1µM, $p < 0,001$; Ko – 10µM, $p < 0,001$) (OMM2.3: Ko – 10fM, $p = 0,8231$; Ko – 100fM, $p = 0,8734$; Ko – 1pM, $p = 0,7457$; Ko – 10pM, $p = 0,8346$; Ko – 100pM, $p = 0,7906$; Ko – 1nM, $p = 0,0045$; Ko – 10nM, $p < 0,001$; Ko – 100nM, $p < 0,001$; Ko – 1µM, $p < 0,001$; Ko – 10µM, $p < 0,001$) (OMM1: Ko – 10fM, $p = 0,9566$; Ko – 100fM, $p = 0,8847$; Ko – 1pM, $p = 0,8325$; Ko – 10pM, $p = 0,3922$; Ko – 100pM, $p = 0,1438$; Ko – 1nM,

$p = 0,0568$; Ko – 10nM, $p = 0,0012$; Ko – 100nM, $p < 0,001$; Ko – 1 μ M, $p < 0,001$; Ko – 10 μ M, $p < 0,001$).

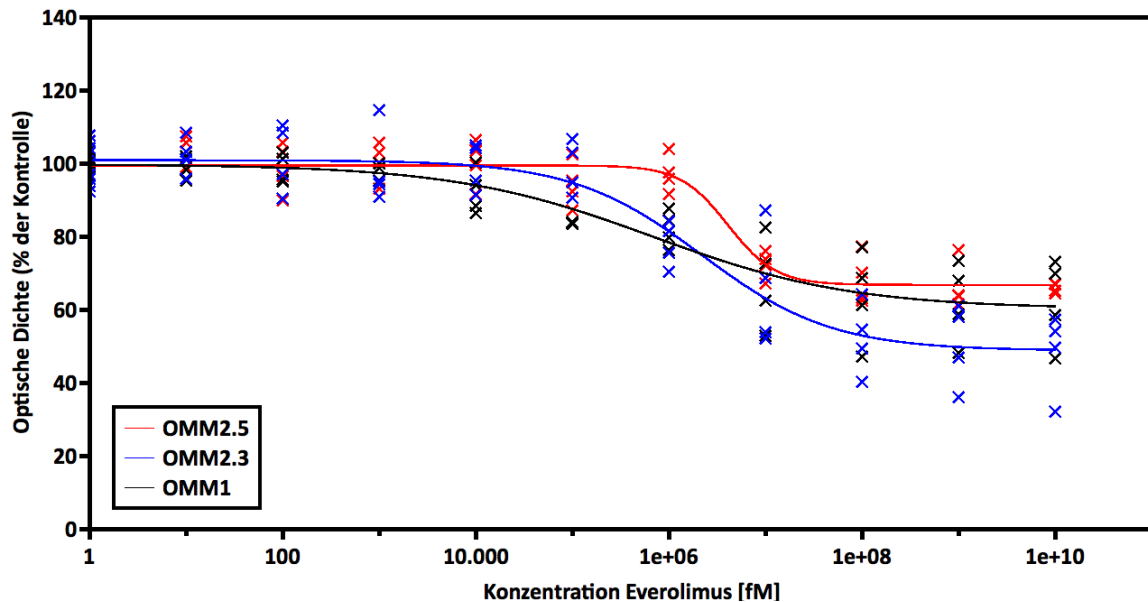


Abbildung 7: Darstellung der Wirkung verschiedener Konzentrationen von Everolimus auf die Zellproliferation an nicht-konfluenten OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen nach 72h. Die optische Dichte im XTT-Test drückt die Anzahl der Zellen aus. Die Abbildung zeigt eine logarithmische Regression (Dosis-Wirkungs-Kurve von Everolimus auf Proliferation der OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen). Mittels der Ergebnisse der Regression wurde die IC_{50} bestimmt für OMM2.5 ($4,09\text{nM} \pm 1,39\text{nM SD}$) ($R^2 = 0,90$), OMM2.3 ($2,22\text{nM} \pm 1,12\text{nM SD}$) ($R^2 = 0,87$) und OMM1 ($0,68\text{nM} \pm 0,54\text{nM SD}$) ($R^2 = 0,83$).

Erufosin

Die Proliferation der Zellreihen OMM2.3, OMM2.5 und OMM1 wurde durch Erufosin bei keiner Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Erufosin signifikant ($p < 0,05$) reduziert (siehe **Abb. 8**). Da eine Reduktion der Proliferation unter Erufosin-Behandlung ausblieb, konnte keine Schätzung der IC_{50} anhand einer logarithmischen Regression vollzogen werden. (OMM2.5: Ko – 10nm, $p = 0,9044$; Ko – 100nM, $p = 0,9558$; Ko – 500nM, $p = 0,8110$; Ko – 1 μ M, $p = 0,8045$; Ko – 2,5 μ M, $p = 0,8513$; Ko – 5 μ M, $p = 0,7754$; Ko – 7,5 μ M, $p = 0,9919$; Ko – 10 μ M, $p = 0,6570$; Ko – 17,5 μ M, $p = 0,6604$; Ko – 25 μ M, $p = 0,3823$) (OMM2.3: Ko – 10nm, $p = 0,6275$; Ko – 100nM, $p = 0,9261$; Ko – 500nM, $p = 0,7238$; Ko – 1 μ M, $p = 0,4187$; Ko – 2,5 μ M, $p = 0,9597$; Ko – 5 μ M, $p = 0,0971$; Ko – 7,5 μ M, $p = 0,6140$; Ko – 10 μ M, $p = 0,7100$; Ko – 17,5 μ M, $p = 0,7349$; Ko – 25 μ M, $p = 0,8384$) (OMM1: Ko – 10nm, $p = 0,3511$; Ko – 100nM, $p = 0,7830$; Ko – 500nM, $p = 0,5736$; Ko – 1 μ M, $p = 0,9076$; Ko – 2,5 μ M, $p = 0,6783$; Ko – 5 μ M,

$p = 0,7477$; Ko – $7,5\mu\text{M}$, $p = 0,2272$; Ko – $10\mu\text{M}$, $p = 0,9795$; Ko – $17,5\mu\text{M}$, $p = 0,2727$; Ko – $25\mu\text{M}$, $p = 0,9296$).

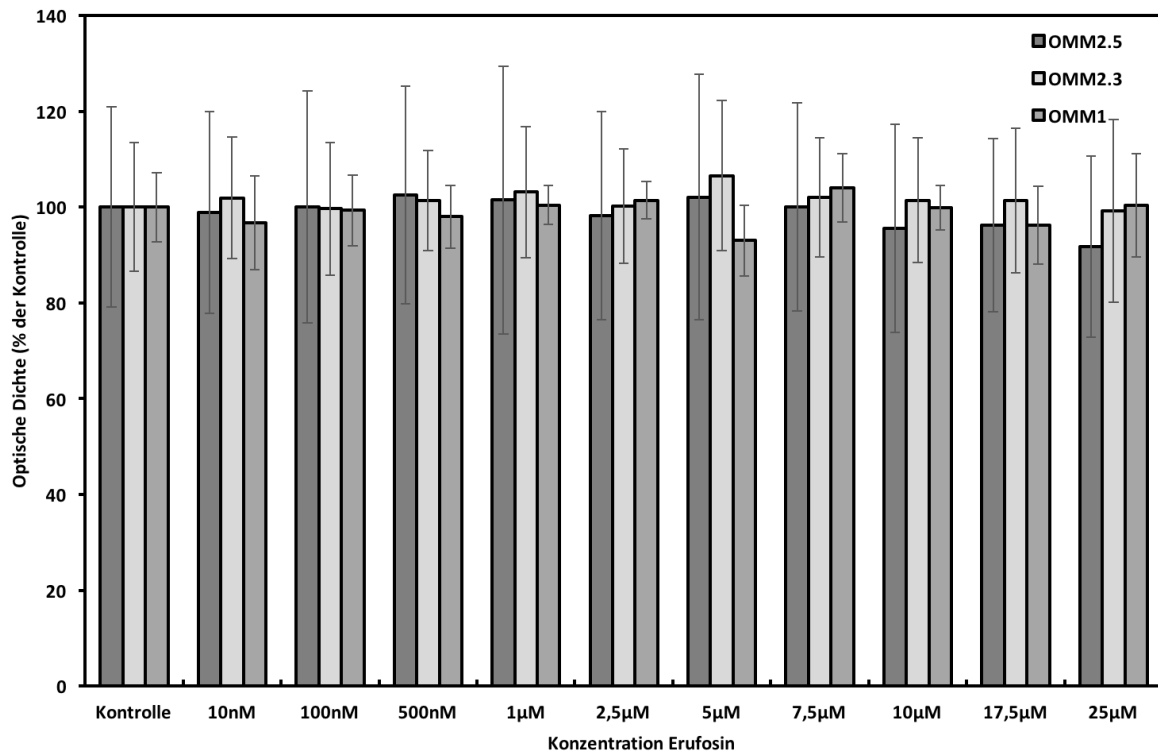


Abbildung 8: Darstellung der Wirkung verschiedener Konzentrationen von Erufosin auf die Zellproliferation von nicht-konfluenten OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen nach 72h Inkubationszeit. Die optische Dichte im XTT-Test drückt die Anzahl der Zellen aus. Die Daten wurden gegen den Mittelwert der Kontrolle normalisiert und sind als Prozentwert angegeben. Konzentrationen die eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der Proliferation von OMM2.5 Zellen zur Folge haben sind mit * markiert, bei OMM2.3 Zellen stellen † und bei OMM1 Zellen ‡ eine signifikante Reduktion der Proliferation dar.

1.19 Erlotinib, Selumetinib, Trametinib, Everolimus, Erufosin und deren Wirkung auf die Zellviabilität am Zellkulturmodell von OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen

Neben der Untersuchung der Wirkung der Pharmaka auf die Zellproliferation von nicht-konfluenten Zellen, wurden die Zellreihen OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 auch unter konfluenten Bedingungen verschiedenen Konzentrationen von Erlotinib, Selumetinib, Trametinib, Everolimus und Erufosin ausgesetzt und der Effekt auf die Zellviabilität untersucht. Zusätzlich wurde die Wirkung verschiedener Konzentrationen der Pharmaka auf die drei Zellreihen in einem Double-stain-apoptosis-detection-Farbstoff-Ausschlusstest getestet um zu untersuchen, ob die potenziellen Veränderungen der optischen Dichte im XTT-Test auf nekrotische Prozesse im Rahmen der Zytotoxizität oder mit anderen Faktoren wie

beispielsweise Zelltod durch Apoptose oder Variation der Stoffwechselaktivität zurückzuführen sind.

Erlotinib

Im XTT-Assay konnte bei allen untersuchten Konzentrationen von Erlotinib in allen Zellreihen keine signifikante Abnahme der Lebensfähigkeit beobachtet werden (siehe **Abb. 9**). (OMM2.5: Ko – 25nM, $p = 0,8978$; Ko – 250nM, $p = 0,7078$; Ko – 500nM, $p = 0,9967$; Ko – 1 μ M, $p = 0,8030$; Ko – 5 μ M, $p = 0,8293$; Ko – 10 μ M, $p = 0,8247$; Ko – 25 μ M, $p = 0,6816$; Ko – 50 μ M, $p = 0,7205$; Ko – 100 μ M, $p = 0,9780$) (OMM2.3: Ko – 25nM, $p = 0,8305$; Ko – 250nM, $p = 0,8638$; Ko – 500nM, $p = 0,8717$; Ko – 1 μ M, $p = 0,6253$; Ko – 5 μ M, $p = 0,5769$; Ko – 10 μ M, $p = 0,9691$; Ko – 25 μ M, $p = 0,3199$; Ko – 50 μ M, $p = 0,6836$; Ko – 100 μ M, $p = 0,6341$) (OMM1: Ko – 25nM, $p = 0,8972$; Ko – 250nM, $p = 0,9325$; Ko – 500nM, $p = 0,9744$; Ko – 1 μ M, $p = 0,7781$; Ko – 5 μ M, $p = 0,8142$; Ko – 10 μ M, $p = 0,8121$; Ko – 25 μ M, $p = 0,5463$; Ko – 50 μ M, $p = 0,5657$; Ko – 100 μ M, $p = 0,5892$).

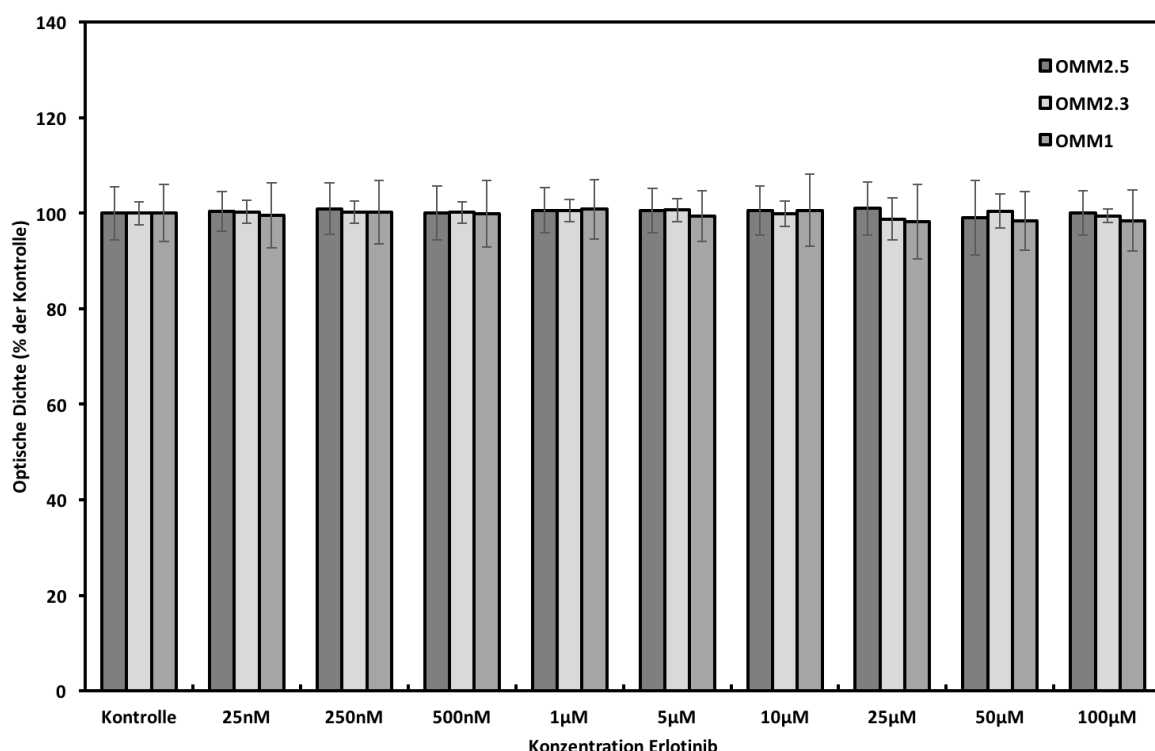


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Wirkung verschiedener Konzentrationen von Erlotinib auf die Zellviabilität von konfluenten OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen nach 24h Inkubationszeit. Die Anzahl der Zellen wird durch die optische Dichte im XTT-Test wiedergespiegelt. Die Daten wurden gegen den Mittelwert der Kontrolle normalisiert und sind als Prozentwert angegeben. Konzentrationen die eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der

Zellviabilität von OMM2.5 Zellen zur Folge haben sind mit * markiert, bei OMM2.3 Zellen stellen † und bei OMM1 Zellen ‡ eine signifikante Reduktion der Lebensfähigkeit dar.

Des Weiteren konnte im Double-stain-apoptosis-detection-Farbstoff-Ausschlusstest bei keiner der drei Zellreihen unter den untersuchten Erlotinib Konzentrationen eine signifikante Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen beobachtet werden (siehe **Abb. 10**), die Anzahl nekrotischer Zellen war in allen Konzentrationen gleich und gegenüber der Kontrolle nicht signifikant verändert (OMM2.5: $p=0,9998$; OMM2.3: $p=0,9591$; OMM1: $p=0,9967$).

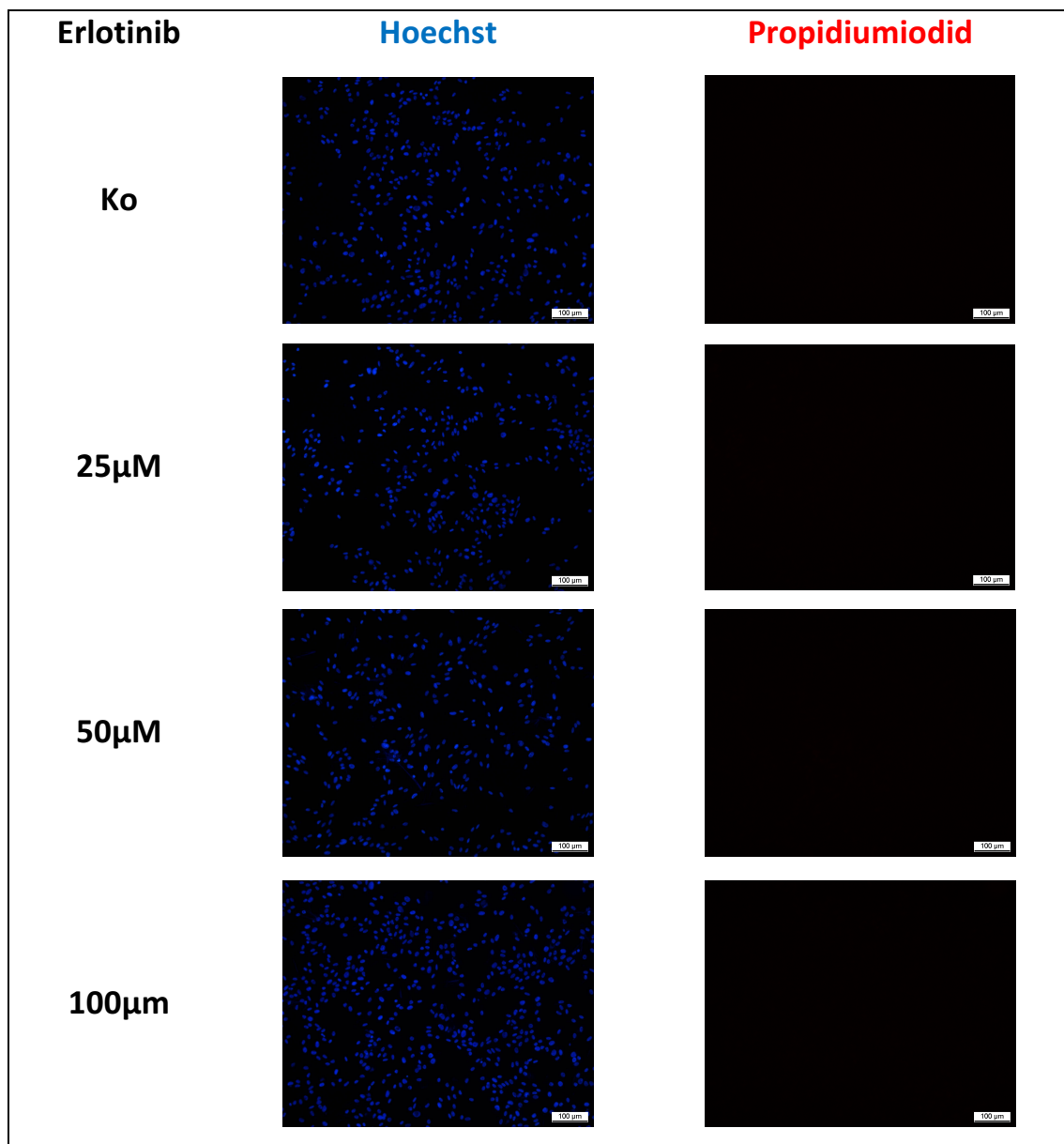


Abbildung 10: Double-stain-apoptosis-detection-Farbstoff-Ausschlusstest verschiedener Konzentrationen von Erlotinib, Ergebnisse für OMM2.5 repräsentativ für alle Zellreihen ausgewählt, da alle vergleichbare Ergebnisse zeigten. Hoechst 33345 färbt die DNA aller Zellen

blau, Propidiumiodid kann intakte Zellmembranen lebender Zellen nicht überschreiten und färbt nur die DNA toter, nekrotischer Zellen. In allen drei Zellreihen konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen und der Kontrolle bei der Auszählung toter Zellen im Vergleich zu allen Zellen beobachtet werden ($p > 0,05$).

Selumetinib

Im XTT-Assay zeigte sich bei den untersuchten Konzentrationen von Selumetinib bei OMM2.5 und OMM2.3 Zellen im Bereich zwischen 100nM und 200µM eine signifikante Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen, bei OMM1 Zellen konnte eine signifikante Abnahme der Zellviabilität zwischen 1µM und 200µM beobachtet werden (siehe **Abb. 11**). (OMM2.5: Ko – 1nM, $p = 0,9638$; Ko – 10nM, $p = 0,5905$; Ko – 100nM, $p = 0,0336$; Ko – 1µM, $p < 0,001$; Ko – 5µM, $p < 0,001$; Ko – 10µM, $p < 0,001$; Ko – 25µM, $p < 0,001$; Ko – 50µM, $p < 0,001$; Ko – 100µM, $p < 0,001$; Ko – 200µM, $p < 0,001$) (OMM2.3: Ko – 1nM, $p = 0,9053$; Ko – 10nM, $p = 0,7770$; Ko – 100nM, $p = 0,0338$; Ko – 1µM, $p < 0,001$; Ko – 5µM, $p < 0,001$; Ko – 10µM, $p < 0,001$; Ko – 25µM, $p < 0,001$; Ko – 50µM, $p < 0,001$; Ko – 100µM, $p < 0,001$; Ko – 200µM, $p < 0,001$) (OMM1: Ko – 1nM, $p = 0,9409$; Ko – 10nM, $p = 0,8876$; Ko – 100nM, $p = 0,2369$; Ko – 1µM, $p = 0,0392$; Ko – 5µM, $p < 0,001$; Ko – 10µM, $p < 0,001$; Ko – 25µM, $p < 0,001$; Ko – 50µM, $p < 0,001$; Ko – 100µM, $p < 0,001$; Ko – 200µM, $p < 0,001$).

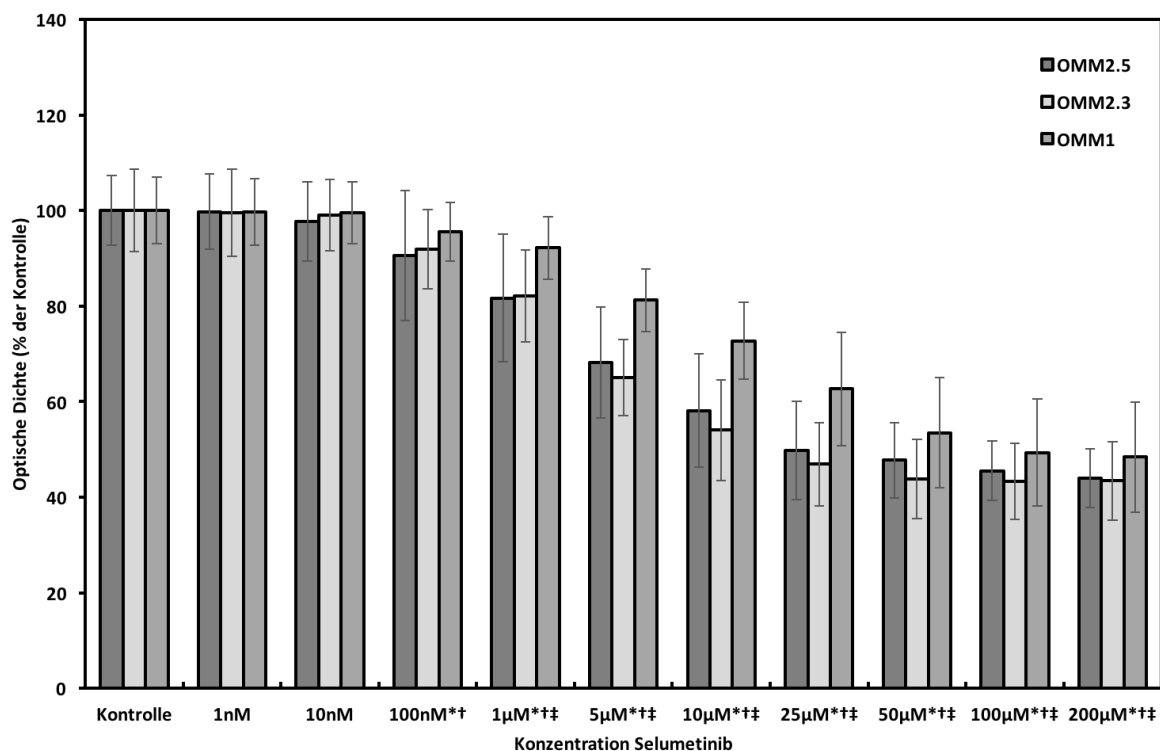
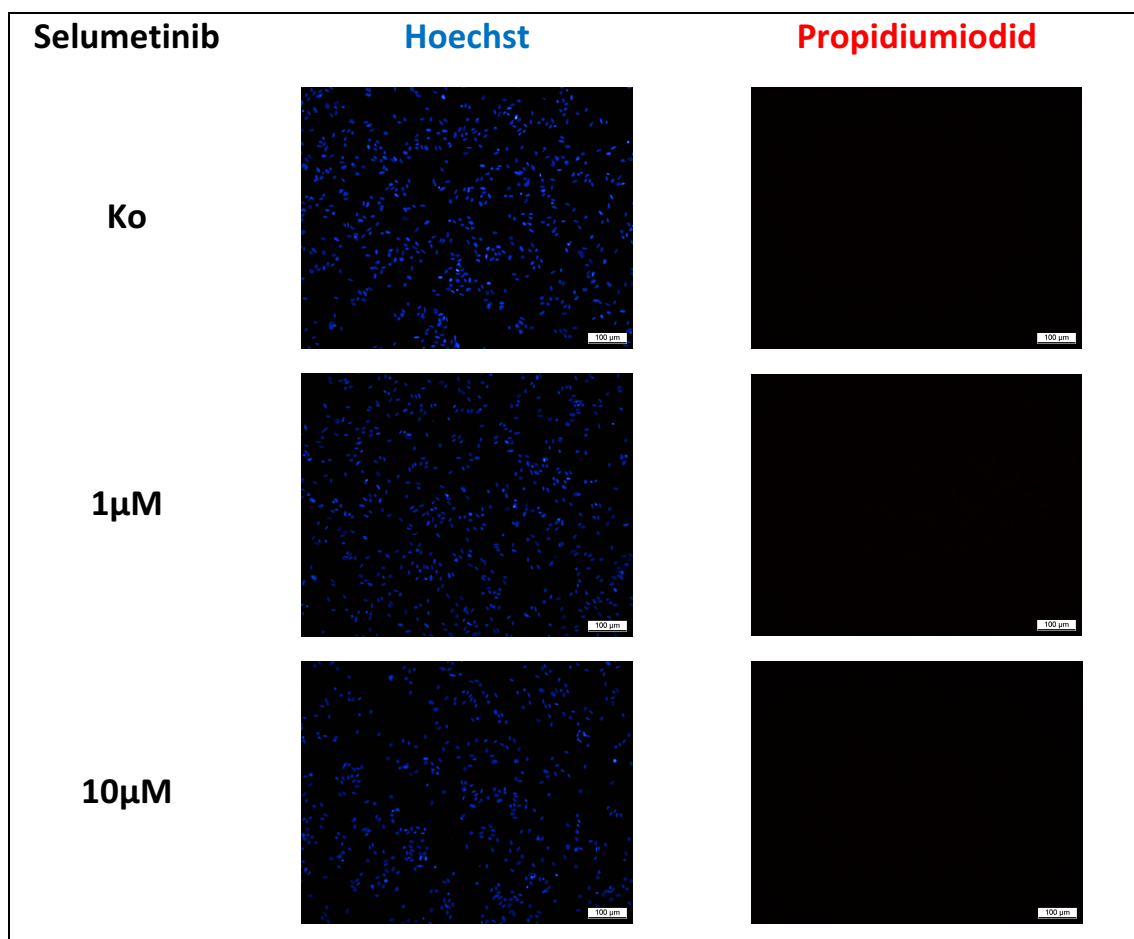


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Wirkung verschiedener Konzentrationen von Selumetinib auf die Zellviabilität von konfluenten OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen nach 24h Inkubationszeit. Die Anzahl der Zellen wird durch die optische Dichte im XTT-Test wiedergespiegelt. Die Daten wurden gegen den Mittelwert der Kontrolle normalisiert und sind als Prozentwert angegeben. Konzentrationen die eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der Zellviabilität von OMM2.5 Zellen zur Folge haben sind mit * markiert, bei OMM2.3 Zellen stellen † und bei OMM1 Zellen ‡ eine signifikante Reduktion der Lebensfähigkeit dar.

Des Weiteren konnte im Double-stain-apoptosis-detection-Farbstoff-Ausschlusstest bei keiner der drei Zellreihen unter den untersuchten Selumetinib Konzentrationen eine signifikante Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen beobachtet werden (siehe **Abb. 12**), die Anzahl nekrotischer Zellen war in allen Konzentrationen gleich und gegenüber der Kontrolle nicht signifikant verändert (OMM2.5: $p=0,9964$; OMM2.3: $p=0,9169$; OMM1: $p=0,7958$).



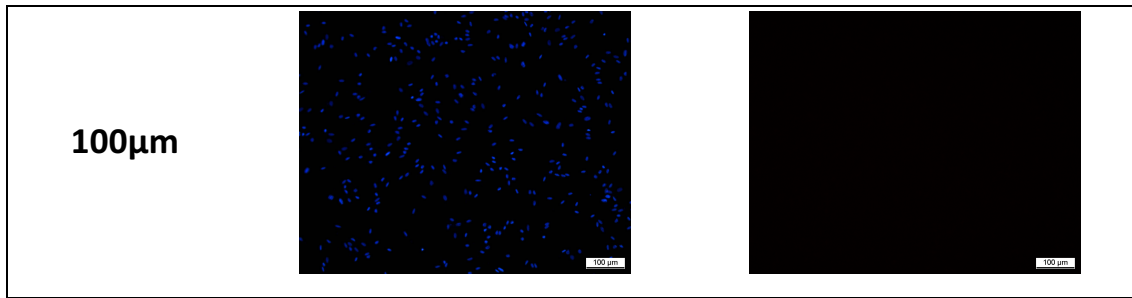


Abbildung 12: Double-stain-apoptosis-detection-Farbstoff-Ausschlusstest verschiedener Konzentrationen von Selumetinib, Ergebnisse für OMM2.5 repräsentativ für alle Zellreihen ausgewählt, da alle vergleichbare Ergebnisse zeigten. Hoechst 33345 färbt die DNA aller Zellen blau, Propidiumiodid kann intakte Zellmembranen lebender Zellen nicht überschreiten und färbt nur die DNA toter, nekrotischer Zellen. In allen drei Zellreihen konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen und der Kontrolle bei der Auszählung toter Zellen im Vergleich zu allen Zellen beobachtet werden ($p > 0,05$).

Trametinib

Im XTT-Assay konnte bei den untersuchten Konzentrationen von Trametinib in allen Zellreihen zwischen 10nM und 50µM eine signifikante Abnahme der Lebensfähigkeit beobachtet werden (siehe **Abb. 13**). (OMM2.5: Ko – 10pM, $p = 0,9183$; Ko – 100pM, $p = 0,8527$; Ko – 1nM, $p = 0,2799$; Ko – 10nM, $p < 0,001$; Ko – 100nM, $p < 0,001$; Ko – 1µM, $p < 0,001$; Ko – 5µM, $p < 0,001$; Ko – 10µM, $p < 0,001$; Ko – 25µM, $p < 0,001$; Ko - 50µM, $p < 0,001$) (OMM2.3: Ko – 10pM, $p = 0,8480$; Ko – 100pM, $p = 0,8554$; Ko – 1nM, $p = 0,9693$; Ko – 10nM, $p < 0,001$; Ko – 100nM, $p < 0,001$; Ko – 1µM, $p < 0,001$; Ko – 5µM, $p < 0,001$; Ko – 10µM, $p < 0,001$; Ko – 25µM, $p < 0,001$; Ko - 50µM, $p < 0,001$) (OMM1: Ko – 10pM, $p = 0,9715$; Ko – 100pM, $p = 0,6787$; Ko – 1nM, $p = 0,1598$; Ko – 10nM, $p < 0,001$; Ko – 100nM, $p < 0,001$; Ko – 1µM, $p < 0,001$; Ko – 5µM, $p < 0,001$; Ko – 10µM, $p < 0,001$; Ko – 25µM, $p < 0,001$; Ko - 50µM, $p < 0,001$).

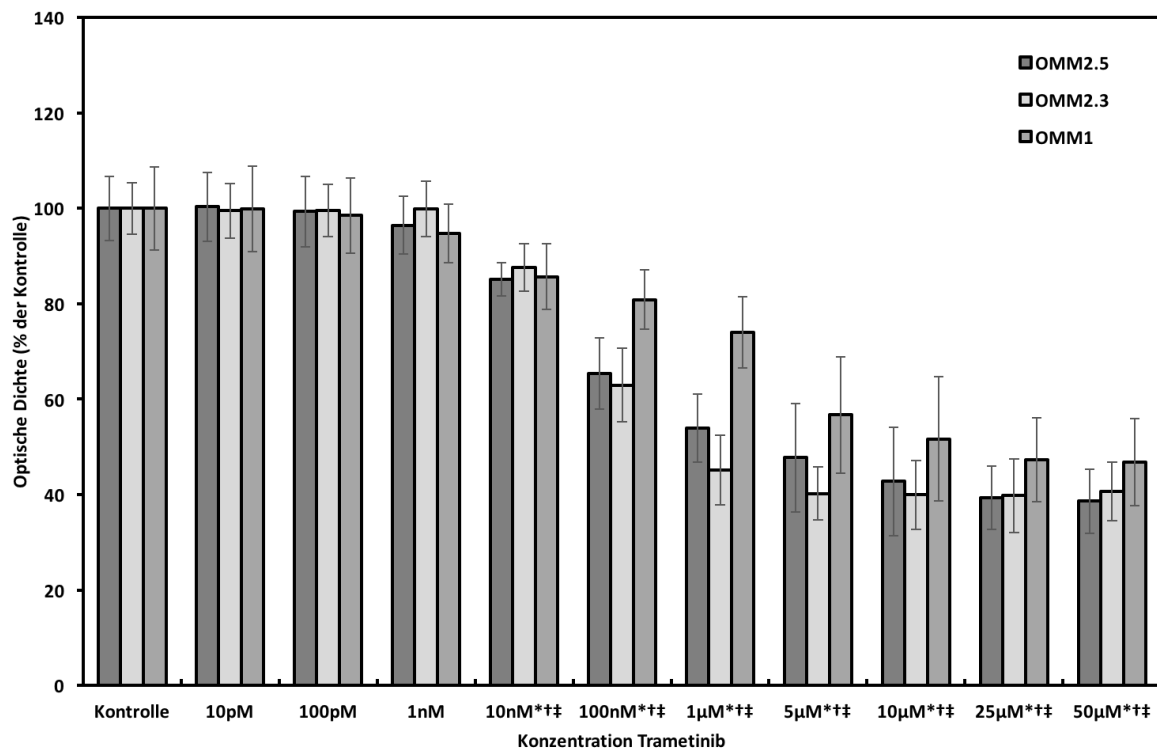
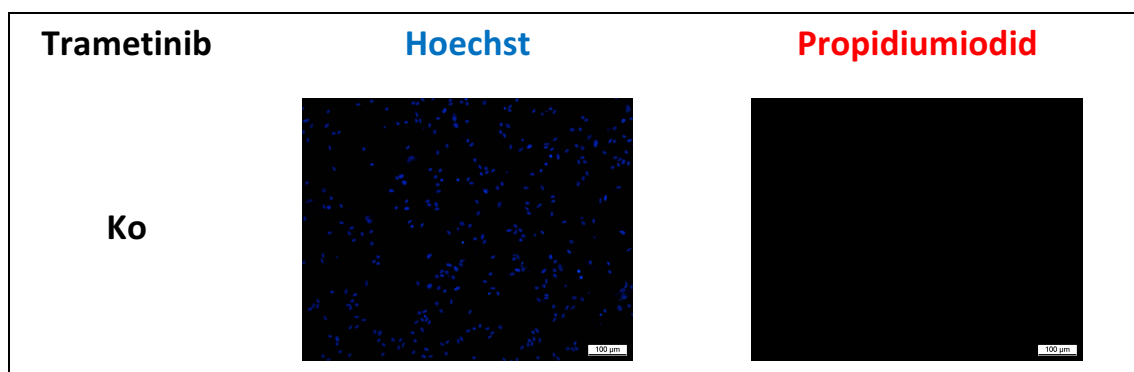


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Wirkung verschiedener Konzentrationen von Trametinib auf die Zellviabilität von konfluenten OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen nach 24h Inkubationszeit. Die Anzahl der Zellen wird durch die optische Dichte im XTT-Test wiedergespiegelt. Die Daten wurden gegen den Mittelwert der Kontrolle normalisiert und sind als Prozentwert angegeben. Konzentrationen die eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der Zellviabilität von OMM2.5 Zellen zur Folge haben sind mit * markiert, bei OMM2.3 Zellen stellen † und bei OMM1 Zellen ‡ eine signifikante Reduktion der Lebensfähigkeit dar.

Des Weiteren konnte im Double-stain-apoptosis-detection-Farbstoff-Ausschlusstest bei keiner der drei Zellreihen unter den untersuchten Trametinib Konzentrationen eine signifikante Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen beobachtet werden (siehe **Abb. 14**), die Anzahl nekrotischer Zellen war in allen Konzentrationen gleich und gegenüber der Kontrolle nicht signifikant verändert (OMM2.5: $p=0,8104$; OMM2.3: $p=0,9389$; OMM1: $p=0,8671$).



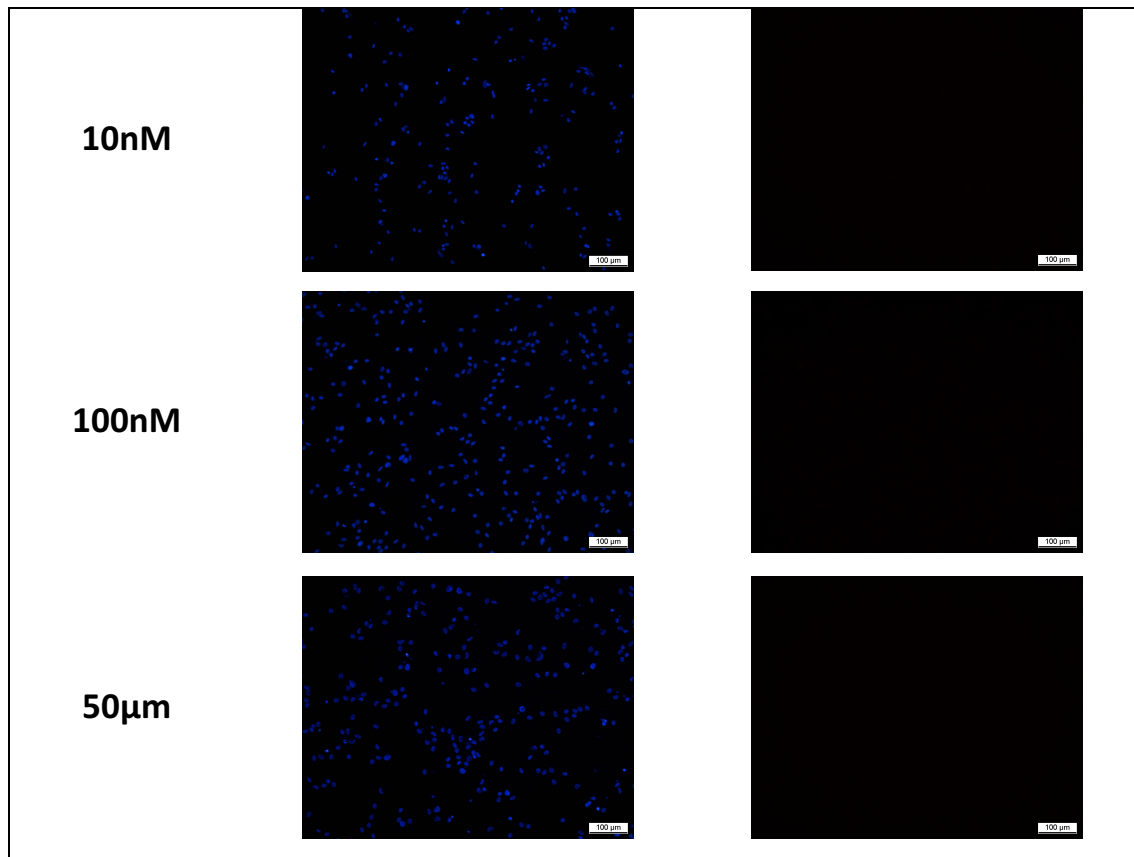


Abbildung 14: Double-stain-apoptosis-detection-Farbstoff-Ausschlusstest verschiedener Konzentrationen von Trametinib, Ergebnisse für OMM2.5 repräsentativ für alle Zellreihen ausgewählt, da alle vergleichbare Ergebnisse zeigten. Hoechst 33345 färbt die DNA aller Zellen blau, Propidiumiodid kann intakte Zellmembranen viabler Zellen nicht überschreiten und färbt nur die DNA toter, nekrotischer Zellen. In allen drei Zellreihen konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen und der Kontrolle bei der Auszählung toter Zellen im Vergleich zu allen Zellen beobachtet werden ($p > 0,05$).

Everolimus

Im XTT-Assay konnte bei allen untersuchten Konzentrationen von Everolimus in allen Zellreihen keine signifikante Abnahme der Lebensfähigkeit beobachtet werden (siehe **Abb. 15**). (OMM2.5: Ko – 100fM, $p = 0,9751$; Ko – 1pM, $p = 0,7831$; Ko – 10pM, $p = 0,6997$; Ko – 100pM, $p = 0,8168$; Ko – 1nM, $p = 0,1296$; Ko – 10nM, $p = 0,2155$; Ko – 100nM, $p = 0,1923$; Ko – 1µM, $p = 0,1905$; Ko – 10µM, $p = 0,2432$; Ko – 100µM, $p = 0,1435$) (OMM2.3: Ko – 100fM, $p = 0,9493$; Ko – 1pM, $p = 0,9623$; Ko – 10pM, $p = 0,9779$; Ko – 100pM, $p = 0,8957$; Ko – 1nM, $p = 0,9959$; Ko – 10nM, $p = 0,8027$; Ko – 100nM, $p = 0,9456$; Ko – 1µM, $p = 0,8027$; Ko – 10µM, $p = 0,8912$; Ko – 100µM, $p = 0,6661$) (OMM1: Ko – 100fM, $p = 0,4737$; Ko – 1pM, $p = 0,6215$; Ko – 10pM, $p = 0,9452$; Ko – 100pM, $p = 0,8906$; Ko – 1nM, $p = 0,7578$; Ko – 10nM, $p = 0,7983$;

Ko – 100nM, $p = 0,5378$; Ko – 1 μ M, $p = 0,3789$; Ko – 10 μ M, $p = 0,6623$; Ko – 100 μ M, $p = 0,1640$).

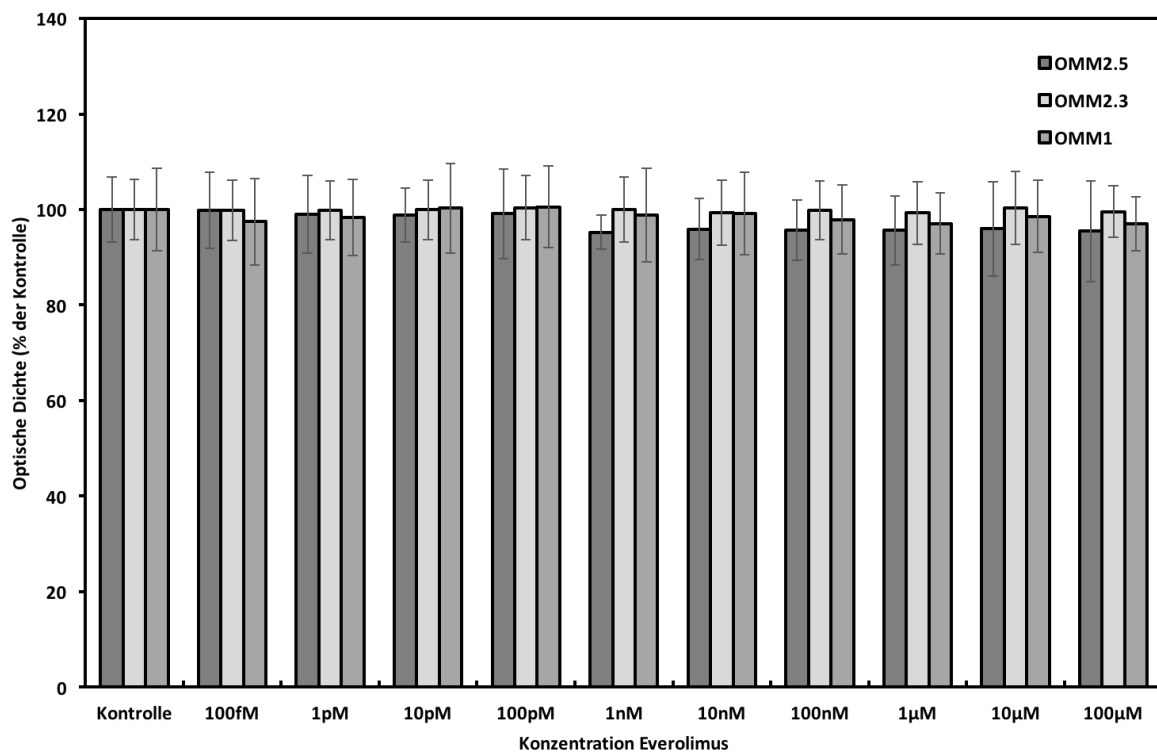


Abbildung 15: Graphische Darstellung der Wirkung verschiedener Konzentrationen von Everolimus auf die Zellviabilität von konfluenten OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen nach 24h Inkubationszeit. Die Anzahl der Zellen wird durch die optische Dichte im XTT-Test wiedergespiegelt. Die Daten wurden gegen den Mittelwert der Kontrolle normalisiert und sind als Prozentwert angegeben. Konzentrationen die eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der Zellviabilität von OMM2.5 Zellen zur Folge haben sind mit * markiert, bei OMM2.3 Zellen stellen † und bei OMM1 Zellen ‡ eine signifikante Reduktion der Lebensfähigkeit dar.

Des Weiteren konnte im Double-stain-apoptosis-detection-Farbstoff-Ausschlusstest bei keiner der drei Zellreihen unter den untersuchten Everolimus Konzentrationen eine signifikante Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen beobachtet werden (siehe **Abb. 16**), die Anzahl nekrotischer Zellen war in allen Konzentrationen gleich und gegenüber der Kontrolle nicht signifikant verändert (OMM2.5: $p=0,7480$; OMM2.3: $p>0,9999$; OMM1: $p=0,9678$).

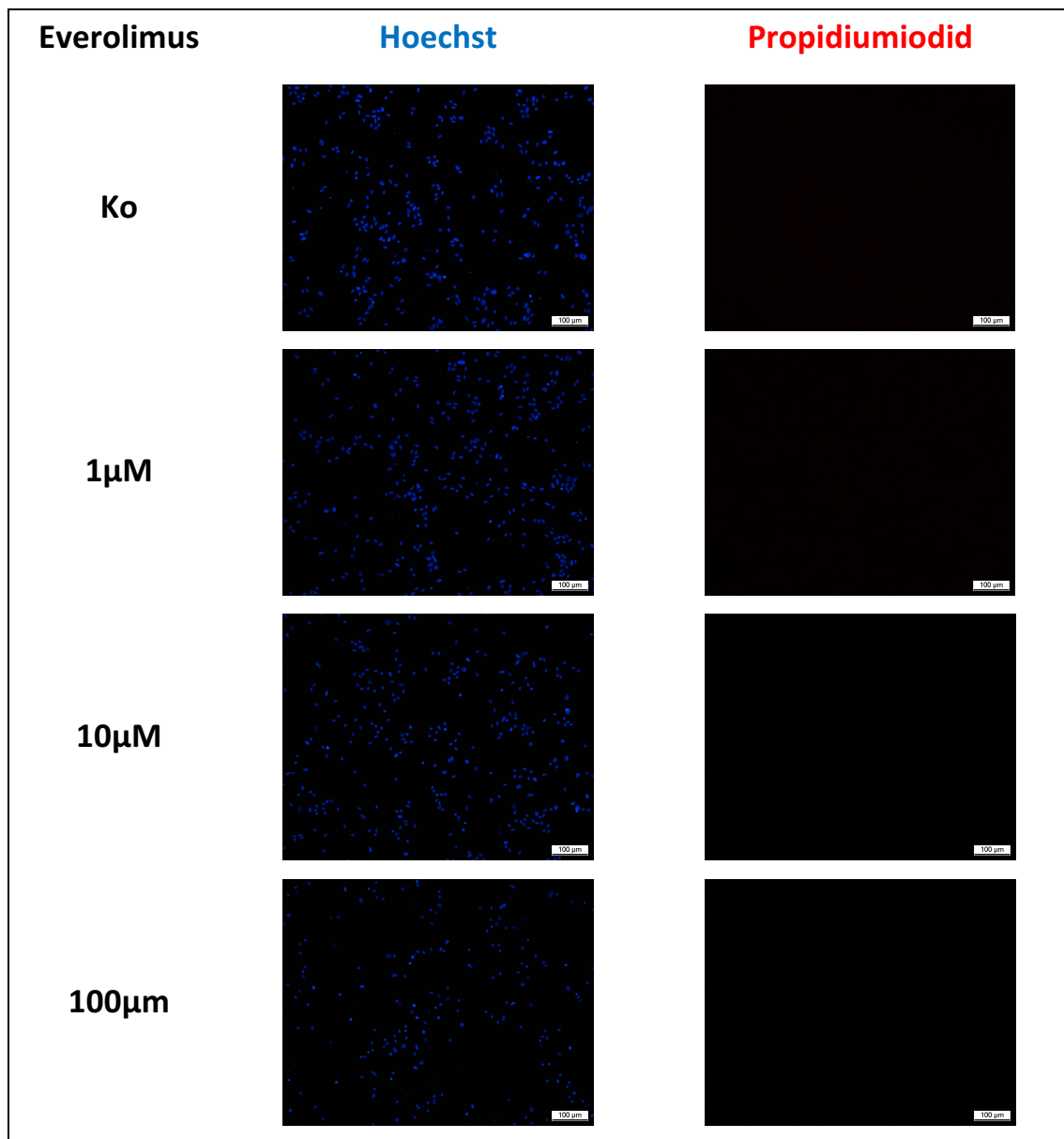


Abbildung 16: Double-stain-apoptosis-detection-Farbstoff-Ausschlusstest verschiedener Konzentrationen von Everolimus, Ergebnisse für OMM2.5 repräsentativ für alle Zellreihen ausgewählt, da alle vergleichbare Ergebnisse zeigten. Hoechst 33345 färbt die DNA aller Zellen blau, Propidiumiodid kann intakte Zellmembranen viabler Zellen nicht überschreiten und färbt nur die DNA toter, nekrotischer Zellen. In allen drei Zellreihen konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen und der Kontrolle bei der Auszählung toter Zellen im Vergleich zu allen Zellen beobachtet werden ($p < 0,001$).

Erufosin

Im XTT-Assay konnte bei den untersuchten Konzentrationen von Erufosin in allen Zellreihen zwischen 10μM und 199μM eine signifikante Abnahme der Lebensfähigkeit beobachtet werden (siehe **Abb. 17**). (OMM2.5: Ko – 10nM, $p = 0,9888$; Ko – 100nM, $p = 0,8881$; Ko – 1μM, $p = 0,8535$; Ko – 5μM, $p = 0,9991$; Ko – 10μM, $p < 0,001$; Ko – 25μM, $p < 0,001$; Ko – 50μM,

$p < 0,001$; Ko – 100 μ M, $p < 0,001$; Ko – 150 μ M, $p < 0,001$; Ko – 199 μ M, $p < 0,001$) (OMM2.3: Ko – 10nM, $p = 0,9643$; Ko – 100nM, $p = 0,6253$; Ko – 1 μ M, $p = 0,5407$; Ko – 5 μ M, $p = 0,2804$; Ko – 10 μ M, $p < 0,001$; Ko – 25 μ M, $p < 0,001$; Ko – 50 μ M, $p < 0,001$; Ko – 100 μ M, $p < 0,001$; Ko – 150 μ M, $p < 0,001$; Ko – 199 μ M, $p < 0,001$) (OMM1: Ko – 10nM, $p = 0,9729$; Ko – 100nM, $p = 0,7918$; Ko – 1 μ M, $p = 0,7010$; Ko – 5 μ M, $p = 0,6330$; Ko – 10 μ M, $p < 0,001$; Ko – 25 μ M, $p < 0,001$; Ko – 50 μ M, $p < 0,001$; Ko – 100 μ M, $p < 0,001$; Ko – 150 μ M, $p < 0,001$; Ko – 199 μ M, $p < 0,001$)

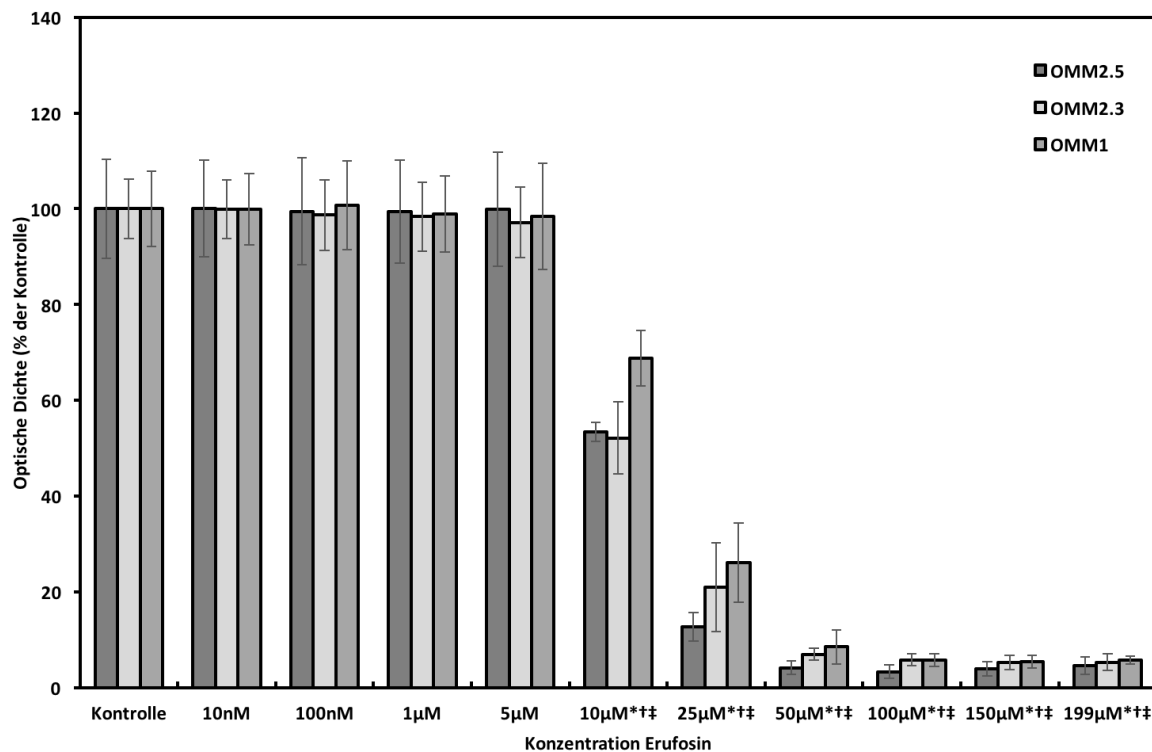


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Wirkung verschiedener Konzentrationen von Erufosin auf die Zellviabilität von konfluenten OMM2.5, OMM2.3 und OMM1 Zellen nach 24h Inkubationszeit. Die Anzahl der Zellen wird durch die optische Dichte im XTT-Test wiedergespiegelt. Die Daten wurden gegen den Mittelwert der Kontrolle normalisiert und sind als Prozentwert angegeben. Konzentrationen die eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der Zellviabilität von OMM2.5 Zellen zur Folge haben sind mit * markiert, bei OMM2.3 Zellen stellen † und bei OMM1 Zellen ‡ eine signifikante Reduktion der Lebensfähigkeit dar.

Im Double-stain-apoptosis-detection-Farbstoff-Ausschlusstest konnte bei allen drei Zellreihen zwischen der Kontrollgruppe und den untersuchten Erufosin Konzentrationen eine signifikante Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen beobachtet werden (siehe **Abb. 18**), die Anzahl nekrotischer Zellen war in allen Konzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verändert (OMM2.5: $p < 0,001$; OMM2.3: $p < 0,001$; OMM1: $p < 0,001$).

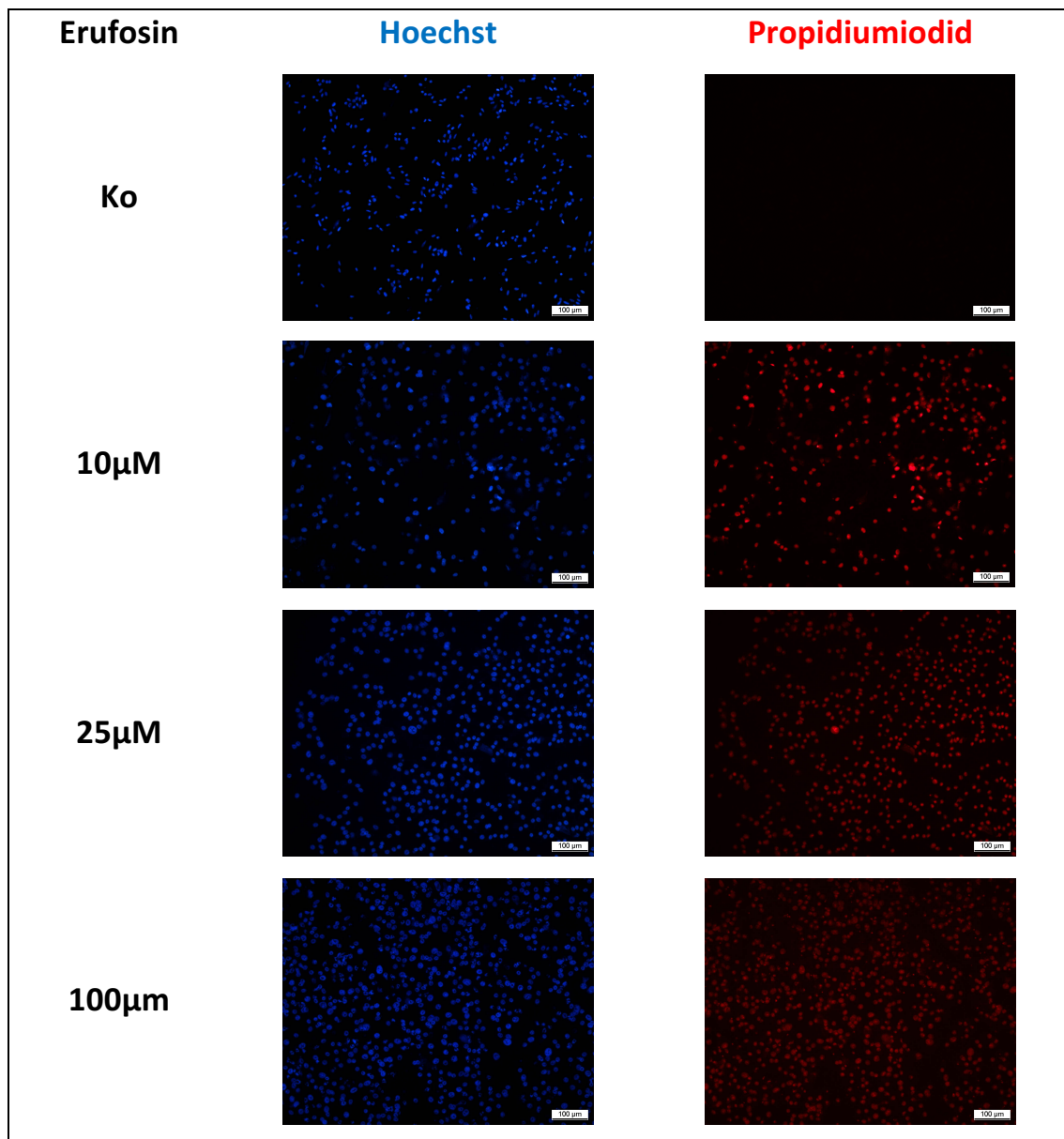


Abbildung 18: Double-stain-apoptosis-detection-Farbstoff-Ausschlusstest verschiedener Konzentrationen von Erufosin, Ergebnisse für OMM2.5 repräsentativ für alle Zellreihen ausgewählt, da alle vergleichbare Ergebnisse zeigten. Hoechst 33345 färbt die DNA aller Zellen blau, Propidiumiodid kann intakte Zellmembranen lebender Zellen nicht überschreiten und färbt nur die DNA toter, nekrotischer Zellen. In allen drei Zellreihen konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen und der Kontrolle bei der Auszählung toter Zellen im Vergleich zu allen Zellen beobachtet werden ($p < 0,001$).

Für jede Zellreihe wurden die blau und rot gefärbten Zellen bei unterschiedlicher Konzentrationseinwirkung gezählt und der Anteil der nekrotischen Zellen an der blau-fluoreszierenden Gesamtzellzahl ermittelt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle in Prozent angegeben.

Erufosin	OMM2.3	OMM2.5	OMM1
10µM	30%	31%	27%
25µM	35%	42%	38%
100µM	72%	79%	74%

Tabelle 3: Darstellung des Anteils toter, rot-fluoreszierender Zellen an der Gesamtzellzahl von OMM2.3, OMM2.5 und OMM1 Zellen im Double-stain-apoptosis-detection-Farbstoff-Ausschlusstest bei unterschiedlichen Erufosin-Konzentrationen. Der angegebene Prozentwert stellt den Mittelwert nach Auszählung aller Versuche dar.

Diskussion

Wie bereits beschrieben ist das Aderhautmelanom die häufigste intraokuläre Tumorentität [2]. Dieser hochaggressive Tumor führt bei einem Großteil der Patienten trotz erfolgreicher Primärtherapie zur Metastasierung, vornehmlich hämatogen in die Leber [18]. Wird eine Metastasierung festgestellt, sind die Therapiemöglichkeiten stark beschränkt und die Überlebenszeit des Patienten auf nur wenige Monate reduziert [14, 15]. Folglich ist es von großer Bedeutung, systemtherapeutische Behandlungskonzepte zu erforschen und langfristig für die Indikationsstellung beim metastasierten Aderhautmelanom zu etablieren [137].

Um diese Zielsetzung umsetzen zu können, ist es wichtig, für die Fragestellung relevante Zelllinien zu beziehen. Da die lokale Therapie des Aderhautmelanoms zufriedenstellend gewährleistet werden kann, fokussierten wir uns auf die Therapie der Metastasen. Die in dieser Studie verwendeten Zelllinien sind zwei vom Aderhautmelanom abstammende Lebermetastasen OMM2.3 und OMM2.5 (GNAQ Q209P) und die Aderhaut-Subkutan-Metastase OMM1 (GNA11 G209L) [187]. Des Weiteren wählten wir die Zellreihen so, dass sie am typischen Locus die GNAQ oder GNA11 Mutationen aufwiesen und zusätzlich an der häufigsten Position (Q209) mutiert waren.

Diese Arbeit konnte bestätigen, dass die MEK-Inhibitoren Selumetinib und Trametinib das Zellwachstum als typische Grundlage der Melanommetastasierung aller drei Zellreihen OMM2.3, OMM2.5 und OMM1 signifikant hemmen. Die Wirksamkeit wird nicht nur durch die Hemmung der Proliferation, sondern auch durch direkte Beeinflussung des Zellüberlebens erreicht. In unseren in-vitro Versuchen geschieht dies am ehesten durch Apoptose als durch Nekrose. Im Vergleich zu den anderen pharmakologischen Stoffen hemmten Trametinib und Selumetinib am effektivsten die pathogenetischen Grundlagen der Aderhautmelanommetastasierung.

Mehrere Studien haben bereits den Effekt von MEK-Inhibitoren, allen voran Selumetinib, auf unterschiedliche Tumorentitäten inklusive dem Aderhautmelanom untersucht [188]. Ambrosini et al. konnten in GNAQ Zellen mit Q209L/P-Mutation unter Selumetinib-Behandlung eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität im Nanomolar-Konzentrationsbereich (IC_{50} unter $0,1\mu M$) ermitteln [54]. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls nachweisen, dass GNA11-Q209-Zellen sensibel auf Selumetinib reagieren, unter

anderem konnte eine verringerte Proliferation, erniedrigte Werte von pERK, ZyklinD1 und erhöhte p27-Werte ermittelt werden [189]. Auch Trametinib wurde in dieser Indikation getestet, beispielsweise suggerieren die Ergebnisse einer Studie von Khalili et al., dass alleinige MEK-Inhibition durch Trametinib zu Zellzyklusarrest und Wachstumsreduktion der meisten Aderhautmelanomzellen führt [55]. Diese Daten sind vergleichbar mit unseren Ergebnissen, sodass unsere Daten gut in die Literatur passen.

Nicht nur die Ergebnisse zu den beiden MEK-Inhibitoren stehen im Einklang mit der Literatur, auch Bestandteile des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs werden als Zielansatz in der Aderhautmelanomtherapie vorgeschlagen. Der selektive mTOR-Inhibitor Everolimus wurde in-vitro an mehreren relevanten Zellreihen getestet und konnte eine signifikante antiproliferative Wirkung und Einfluss auf die Zellviabilität aufzeigen [187]. Es konnte keine vollständige Inhibition der Viabilität beobachtet werden und die Autoren gaben an, dass der Kurvenverlauf bei Everolimus-Behandlung eher zytostatische als zytotoxische Mechanismen suggeriert. In dieser Arbeit konnte der antiproliferative Effekt der mTOR-Inhibition auf die untersuchten Zellreihen bestätigt werden. Genau wie in der Literatur konnten wir keine zytotoxischen Effekte nachweisen. Die Ergebnisse sind gut mit der Literatur vereinbar. Wie bereits erwähnt, wirkt mTORC1 auf Ziele wie S6K1, die durch Förderung der mRNA Translation eine Rolle in der Proteinsynthese und Zellwachstum spielen [69]. Everolimus und andere Rapamycin-Analogen inhibieren im Gegensatz zu neueren mTOR-Inhibitoren der zweiten Generation lediglich mTORC1 [190], die Aktivierung und Inhibition andere Ziele von AKT werden somit nicht von Everolimus beeinflusst. Unsere Beobachtung der alleinigen antiproliferativen Wirkung könnte somit erklärt werden.

Interessant ist, dass auch Erlotinib eine antitumorale Wirkung auf das Aderhautmelanom hat, obwohl die EGFR-Mutation nicht untersucht wurde. Die Proliferation aller Zellreihen konnte gehemmt werden, die Zellviabilität blieb unbeeinflusst. Die gemessenen Daten stehen im Einklang mit den Daten, die bei anderen Krebsarten, bei denen Erlotinib erfolgreich eingesetzt wurde, erhoben wurden. Es wurde gezeigt, dass die als sicher betrachtete Humanplasmakonzentration (mit geringen Nebenwirkungen) 4g/ml beträgt, was 9,3µM entspricht [191]. Die effektivste Plasmakonzentration im Nagetier bei 50%-iger Inhibition des Zielrezeptors wurde auf 8µM und zirka 12µM für die per os Dosierung beziehungsweise nach intraperitonealer Applikation geschätzt [192]. Der EGF-Rezeptor ist den beiden Kaskaden um

ERK und AKT zwar vorgeschaltet und viele extrazellulären Signale führen über ihn zu deren Aktivierung. Ein geringer Anteil der Aderhautmelanome läuft RTK-vermittelt ab und hier könnte Erlotinib eine bessere Wirkung erzielen. Hauptsächlich findet die Signalisierung aber GPCR-vermittelt ab, über $G\alpha$ kommt es zur konstitutiven Aktivierung der MAPK/MEK/ERK-Kaskade. Erlotinib zeigt aber im Vergleich eine deutlich schlechtere Wirksamkeit als die etablierten MEK- und mTOR-Inhibitoren und dem in dieser Indikation neuen Erufosin.

Großes Augenmerk dieser Arbeit liegt auf Erufosin und seiner potenziell antiproliferativen und viabilitätsreduzierenden Wirkung in Bezug auf das metastasierte Aderhautmelanom. Erufosin ist aufgrund der Interaktion sowohl mit MAPK/ERK als auch mit PI3K/AKT/mTOR (siehe **Abb. 3**) in dieser Indikation aus theoretischen Gesichtspunkten durchaus vielversprechend. Soweit bekannt wurde es noch nicht getestet. Aus diesem Grund müssen zur Interpretation der Ergebnisse Zellreihen anderer Tumoren herangezogen werden. Bei keiner der untersuchten Konzentrationen von Erufosin konnte eine proliferationshemmende Wirkung auf die drei Zellreihen OMM2.3, OMM2.5 und OMM1 beobachtet werden. Diese Erkenntnis ist nicht mit den überschaubaren Beispielen aus der Literatur bezüglich anderer Tumorentitäten vereinbar. Sowohl Erufosin als auch andere Alkylphosphocholine wurden gegen mehrere Neoplasien in-vitro getestet. Beispielsweise konnte bei chronisch myeloischer Leukämie (CML) [193], akuter myeloischer Leukämie (AML) [194, 195], chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) [196], multiplem Myelom (MM) [167, 197], Blasenkarzinom [198], Mammakarzinom [168] und bei oralem Plattenepithelkarzinom [199] jeweils eine signifikante proliferationshemmende Wirksamkeit unter Erufosin-Verwendung erzielt werden. Zelllinien des Blasenkarzinoms, der AML und des MM zeigten eine höhere Sensibilität gegenüber Erufosin in-vitro, die IC_{50} -Werte variierten zwischen $4\mu M$ und $14\mu M$ [195, 197, 198], bei CLL, Mammakarzinom und oralem Plattenepithelkarzinom wurden hingegen höhere IC_{50} -Werte für Erufosin berechnet [168, 196, 199]. Es scheint, dass Erufosin bei den Zelllinien der Aderhautmelanommetastase in dem untersuchten Bereich unterhalb der zytostatischen/-toxischen Konzentrationen keine proliferationshemmende Wirkung entfaltet, was eine antiproliferative Wirkung bei höherer, bisher nicht geprüfter Dosierung aber nicht ausschließt. Im Gegensatz dazu kann eine deutlich signifikante Reduktion der Zellviabilität an der konfluenten Zellkultur beobachtet werden. Ab einer Erufosin-Konzentration von $10\mu M$ konnte eine signifikante Reduktion der Zellzahl in-vitro beobachtet werden. In diesem Versuch zeigt Erufosin als einziges untersuchtes Pharmakon im Vergleich zur Kontrolle innerhalb des

viabilitätsreduzierenden Konzentrationsbereichs einen signifikanten Anstieg des Anteils toter Zellen an der Gesamtzellzahl. Zum einen erlaubt sich die Interpretation, dass Erufosin bei den untersuchten Zellen den Zelltod durch Nekrose einleitet und somit zytotoxisch auf die Aderhautmetastase wirkt. Andererseits würde sich durch den Anteil der toten nekrotischen Zellen an der Gesamtzellzahl im Double-stain-apoptosis-detection-Farbstoff-Ausschlusstest alleine nicht die nahezu vollständige Reduktion der Zellviabilität im XTT-Assay erklären lassen. So entsteht die Vermutung, dass auch andere Mechanismen des Zelltodes wie Apoptose und Autophagie oder anderweitige metabolische Prozesse für den Zelltod der Tumorzellen zuständig sind. Denkbar wäre auch, dass aufgrund der in-vitro nicht vorhandenen Makrophagen keine Phagozytose der apoptotischen Zellen stattfindet und es zur sekundären Permeabilisierung der Membran kommt [200].

Anhand der Ergebnisse für Erufosin lässt sich darstellen, dass dieser Versuchsaufbau zwar Aussagen über die Wirkstoffe und deren Wirkung auf die Proliferation und Zellviabilität der untersuchten Zellreihen erlaubt, es ist jedoch nicht möglich nachzuvollziehen, welche molekularbiologischen Mechanismen für die Reduktion der Zellviabilität verantwortlich sind. Hier würde sich neben der Darstellung nekrotischer Prozesse auch der direkte Nachweis apoptotischer oder autophagischer Abläufe in der Zellkultur anbieten. In der Literatur sind mehrere Tumorentitäten als Beispiele für Apoptoseinduktion durch Erufosin zu finden, das Aderhautmelanom ist in diesem Kontext jedoch noch nicht erforscht worden. Erufosin induziert Apoptose in humanen Zellreihen von CLL [196], AML [194, 195], ALL [201], Mammakarzinom [168], Glioblastom [201-203], Prostatakarzinom [204] und oralem Plattenepithelkarzinom [199]. Mehrere unterschiedliche Signalwege wurden als apoptotischer Modulationsweg von Erufosin beschrieben; Martelli et al. machen JNK-abhängige Mechanismen für die Apoptose in AML-Zellen [195] verantwortlich, Yosifov et al. [197] schreiben der Raf/MEK/ERK-Kaskade die Einleitung der Apoptose bei humanen Myelomzellen zu und bei Versuchen an dem oralen Plattenepithelkarzinom verläuft der programmierte Zelltod über den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg [199]. Kaspasen spielen in der Zelltötung durch Apoptose eine essenzielle Rolle, in mehreren der bereits erwähnten Arbeiten konnte eine dosisabhängige Aktivierung unterschiedlicher Kaspasen (vornehmlich 3 und 7) und die anschließende Spaltung des Kaspase-Substrats PARP nachvollzogen werden: Im Bereich 12,5µM und 25µM konnte PARP-Spaltung bei Prostatakarzinomzellen [204] und zwischen 30µM und 50µM bei dem oralen Plattenepithelkarzinom [199] detektiert werden, in

MM-Zellen führten 10µM zu einer 92-prozentigen Spaltung [197], bei CLL zu einer kompletten Spaltung von PARP zwischen 1µM und 100µM [196]. Zusätzlich konnte bestätigt werden, dass die zytotoxische Wirkung Erufosins durch Kaspase-Inhibitoren deutlich reduziert wurde [195, 196], sodass zumindest ein Teil seiner antineoplastischen Aktivität mit apoptotischen Abläufen assoziiert wird [205]. Aufgrund der Hinweise in der Literatur ergibt sich die Vermutung, dass in unserem Versuch die Reduktion der Zellviabilität und Darstellung toter Zellen auf apoptotische Vorgänge zurückzuführen ist, diese Hypothese muss selbstverständlich in weiteren in-vitro Untersuchungen vorerst bestätigt werden.

Im Gegensatz zu Erufosin finden sich mehrere Versuche, in denen die antitumorale Wirkung von MEK-Inhibitoren und mTOR-Inhibitoren am Aderhautmelanom genauer untersucht wurde. Khalili et al. [55] analysierten den Einfluss des MEK-Inhibitors Trametinib und des PI3K- und mTORC1/2-Inhibitoren Omipalisib (GSK2126458) und mehreren GNAQ- und GNA11-mutierten Zellen. Trotz Veränderungen bezüglich des Zellwachstums und Bewirken eines Zellzyklusarrests, konnten beide Pharmaka keinen signifikanten Anstieg der Spaltprodukte von Kaspase-3 und -7 nachweisen und zeigten keinen oder nur geringfügigen Anhaltspunkt für eine Apoptoseeinleitung. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei Selumetinib gemacht werden, dass in Monotherapie keine ausreichende Zellapoptose in Aderhautmelanomzellen erreichen konnte [54]. Auch Everolimus zeigte in Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Amirouchene-Angelozzi trotz signifikanter Wachstumshemmung in-vitro und in vivo [187] keine in-vitro Apoptoseinduktion und keine Tumorregression in-vivo [75].

Neben MEK, PI3K und mTOR wurde in den letzten Jahren auch vermehrt PKC als potenzielles Target in der Behandlung des metastasierten Aderhautmelanoms gewählt. Der PKC-Inhibitor Sotrastaurin (AEB071) zeigte in-vitro und in-vivo antiproliferative Aktivität in Zellen mit GNAQ- und GNA11-Mutationen [63, 206], jedoch keine Apoptoseinduktion in-vitro und anhand eines Allograft-Modells mit GNAQ/Q209L-Mutation auch keine Apoptose und Tumorregression in-vivo [206].

Die beschriebenen Beispiele aus der Literatur veranschaulichen, dass die untersuchten Wirkstoffe aus theoretischen Überlegungen zwar durchaus für die Monotherapie des metastasierten Aderhautmelanoms geeignet sind und in-vitro auch signifikante Ergebnisse bezüglich Zellproliferation und –viabilität erzielen, allerdings keinen zufriedenstellenden

Einfluss auf die Zelltodeinleitung und Tumorregression vorzeigen konnten. Folglich ist davon auszugehen, dass unterschiedliche Mechanismen greifen, die die Effektivität der einzelnen Inhibitoren der MAPK/MEK/ERK und PI3K/AKT/mTOR Signalwege beschränken.

Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition eines einzelnen Targets zur Induktion von Feedback-Mechanismen führt, die wiederum die zu inhibierende Kaskade über Umgehung der inhibierten Kinase trotzdem in Gang setzen. Beispielsweise belegen mehrere Versuche, dass die Behandlung mit mTORC1-Inhibitoren wie Everolimus über eine Rückkopplung via RTKs, IRS1 und mTORC2 zur Aktivierung von AKT und folglich der nachgeschalteten Kaskade führt [207-209]. Amirouchene-Angelozzi et al. konnten diese Hypothese bestätigen, in-vitro zeigte sich in 85,7% der Modelle ein Anstieg von pPRAS40, das durch AKT phosphoryliert und inaktiviert wird [75] (siehe **Abb. 2**). Auch in-vivo konnte in derselben Arbeit anhand Patienten-abgeleiteten Xenograft-Modellen (PDX) ein Anstieg von pPRAS40 nach mTOR-Inhibition nachgewiesen werden. Ähnliche Feedback-Mechanismen, die letztendlich zur partiellen Reaktivierung von PI3K/AKT, MEK/ERK und anderen Signalwegen führten und dadurch eine komplette Inhibition der jeweiligen Kaskade durch monotherapeutischen Ansatz verhinderten, wurden auch für die direkte Inhibition der Kinasen AKT [210], PI3K [211, 212] und PKC [213] beschrieben.

Weiterhin finden bei der Tumorgenese im Allgemeinen und hier in Bezug auf das Aderhautmelanom mehrere Kreuzaktivierungen zwischen den einzelnen Signalkaskaden statt. Durch Mutation konstitutiv aktivierte GNAQ/GNA11 resultieren nicht nur in einer Aktivierung von ERK, sondern auch die PI3K/AKT/mTOR-Kaskade wird aktiviert und die Signalisierung über GNAQ/GNA11 an AKT übertragen [102]. Die genauen Mechanismen hierfür sind nicht genau bekannt, es wird aber vermutet, dass dies über direkte Bindung von PI3K an GPCR [214] oder über Kreuzverbindungen zwischen GPCR und RTK-vermittelten Signalwegen [215, 216] passiert. Ergebnisse von Amirouchene et al. [187] veranschaulichen, dass eine vermehrte mTOR-Aktivierung, in-vitro durch den erhöhten Nachweis der mTOR-Substrate p4EBP und pS6K bestätigt (siehe **Abb.2**), beim Aderhautmelanom auch in Abwesenheit einer signifikant erhöhten AKT-Aktivierung stattfindet. Die Arbeitsgruppe stellt die Theorie, dass es in Folge einer GNAQ/GNA11-Mutation getriggerten Aktivierung der MAPK-Kaskade über eine Kreuzaktivierung zur mTOR-Aktivierung kommt und der mTOR-nachgeschaltete Signalweg eine Schlüsselfunktion bei GNAQ/GNA11-mutierten Zellen einnimmt. Diese Hypothese konnte

durch Forschungsergebnisse von Khalili et al. [55] verstärkt werden. In einer „reverse phase protein lysate microarray“ (RPPA)-Analyse zeigte sich bei GPCR-mutierten Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen des Aderhautmelanoms eine reduzierte Phosphorylierung von AKT und in vitro eine verminderte Effektivität des PI3K-Inhibitors GSK2126458, der oberhalb von mTOR mit der Kaskade interagiert, in GPCR-mutierten Zellen im Vergleich zu Zellen ohne Mutation. In dieser Arbeit konnten außerdem Kreuzverbindungen zwischen MAPK/MEK/ERK und PI3K/AKT/mTOR hervorgehoben werden; eine Inhibition von MEK führte zum relativen Anstieg von pAKT und reziprok zeigte sich ein Anstieg an phosphoryliertem MAPK nach PI3K-Inhibition. Ähnlicherweise wurde in Versuchen am K-Ras-mutierten Kolorektalkarzinom beschrieben, dass eine MEK-Inhibition mTORC1-Aktivität herunterreguliert, die negative Rückkopplung von mTOR auf IGF-1R/IRS-1 somit entfällt und dies eine Aktivierung von PI3K/AKT zur Folge hat [217].

Zusätzlich entwickeln Aderhautmelanomzellen nach Behandlung Resistenzen gegen Inhibitoren von MAPK/MEK. In Zellen, die nach Behandlung eine Resistenz gegenüber Selumetinib entwickelt haben, konnte erhöhte Expression von DEAD-Box Helicase 43 Gen (DDX43) [218] und c-Jun [219] nachgewiesen werden. DDX43 scheint eine Art Mediatorfunktion bei der Ausbildung einer Resistenz gegenüber MEK-Inhibitoren einzunehmen. Es reguliert die Expression von Ras-Protein und AKT-Aktivierung, Hemmung von DDX43 führte zu verminderter Ras-Protein Expression und verminderter Phosphorylierung von ERK und AKT [218]. C-Jun ist womöglich ein Effektor von DDX43, es konnte durch Knockdown von DDX43 herunterreguliert werden. Nach Knockdown von c-Jun konnte der wachstumshemmende Effekt der MEK-Inhibition in einem Proliferationsassay deutlich verstärkt werden, der Knockdown an sich hatte jedoch nur minimalen Einfluss auf das Zellwachstum. Diese Beobachtungen sind gut vereinbar mit der Annahme, dass DDX43 und c-Jun die Sensitivität und Resistenzbildung der Zellen gegenüber MEK-Inhibitoren medieren und somit die Wirkung der MEK-Inhibitoren als Monotherapie schwächen.

Die Erkenntnis, dass die monotherapeutische Verwendung der jeweiligen Kinase-Inhibitoren aufgrund der bereits erwähnten Mechanismen nicht zu dem erwünschten Erfolg in der Behandlung des metastasierten Aderhautmelanoms geführt hat, hatte in jüngster Vergangenheit ein Umdenken zugunsten der Kombinationstherapie zur Folge.

Eine Kombinationsmöglichkeit, die in unterschiedlichen Versuchen erörtert wurde, repräsentiert die gleichzeitige Inhibition der beiden essenziellen Signalwege MAPK/MEK/ERK und PI3K/AKT/mTOR. Khalili et al. kombinierten Trametinib und den PI3K-Inhibitor Omipalisib, den Ergebnissen zufolge ergibt dieser Ansatz eine signifikante antitumorale Wirkung an GNAQ-mutierten Zellen mit einer deutlich signifikanten Einleitung der Apoptose, veranschaulicht durch die erhöhte Akkumulation von Kaspase-Spaltprodukten [55]. Gegensätzliche Resultate zeigt eine Studie von Ho et al. [56] auf, in der Selumetinib und mTOR-Inhibitoren AZD8055 in dualer Therapie angewandt wurden. Hier konnte in Bezug auf Wachstumshemmung und Apoptoseinduktion in-vitro und in-vivo keine signifikante Veränderung in der gleichen GNAQ-mutierten Zelllinie beobachtet werden. Lediglich BRAF-mutierte Zellreihen und Xenograft-Modelle zeigten Signifikanz, wobei BRAF-Mutationen eine genetische Rarität des Aderhautmelanoms darstellen und diesbezüglich diese Zellen nicht als geeignete Repräsentanten des Aderhautmelanoms angesehen werden sollten.

Die Kombination aus PKC- (AEB071) und MEK-Inhibition (PD0325901 oder MEK162) wurde von Chen et al. [206] in der Zellkultur und in-vivo anhand eines Xenograft-Modells untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass eine Akkumulation von pMEK und pERK nach alleiniger MEK-Inhibition durch die Zugabe des PKC-Inhibitors unterdrückt werden und folglich das Einsetzen eines Feedbackmechanismus außer Kraft gesetzt werden konnte. In-vitro führte die duale Inhibition zu einer erheblichen Inhibition des MAPK/MEK/ERK Signalweges und zeigte synergistische proliferationshemmende und apoptoseinduzierende Wirkung. Am Xenograft-Modell bewirkte die Kombinationstherapie ebenfalls eine deutliche Tumorregression. Die Kombination aus AEB071 und MEK162 wurde auch in einer anderen Arbeitsgruppe um Carita et al. untersucht [81]. Die Behandlung zeigte ebenfalls gute synergistische Ergebnisse in der Zellkultur und eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums in PDX-Modellen, im Gegensatz zu den Ergebnissen an dem Xenograft-Modell von Chen et al. konnte keine Tumorstabilisierung oder –regression erzielt werden. Eine Phase-I/II-Studie dieser Wirkstoffkombination in der Therapie des metastasierten Aderhautmelanoms wurde initiiert, musste allerdings wegen erhöhter Toxizität frühzeitig abgebrochen werden (NCT01801358) [220]. Unter ähnlichen Versuchsbedingungen untersuchten Musi et al. die Inhibition von PKC in Kombination mit PI3K-Inhibition (selektiver PI3K-Inhibitor BYL719) [221]. In-vitro war eine synergistische antitumorale Wirkung der Kombination nachweisbar und es ließ sich eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums am in-vivo Xenograft-Modell darstellen. Diese

Ergebnisse haben dazu geführt, dass eine Phase Ib-Studie (NCT02273219) [222] eingeleitet wurde, die Patienten mit metastasiertem Aderhautmelanom zur Kombinationstherapie mit PKC-Inhibitor AEB071 und PI3K-Inhibitor BYL719 rekrutiert. Neben der Kombination aus AEB071 und MEK162 prüften Carita et al. auch AEB071 in Kombination mit Everolimus oder dem p53-MDM2-Inhibitor CGM097 [81]. Beide Schemata führten zu signifikanter Reduktion der Zellviabilität und Apoptoseinduktion in den meisten in-vitro untersuchten Zellreihen. In-vivo konnten beide Kombinationsstrategien mehrheitlich an einem aus fünf verschiedenen PDX (MP42, MP46, MP55, MM33 und MM52) bestehenden Versuchsmodell zur Tumorregression und –stabilisierung führen, wobei der Kombination mit CGM097 durch vermutlich additive Wirkung ein leichter Vorteil gegenüber der eher synergistisch wirkenden Kombination mit Everolimus zugesprochen wurde.

Eine weitere Kombination, die vielversprechende präklinische Ergebnisse erzielen konnte, stellt die Kombination von Everolimus mit dem PI3K-Inhibitor GDC0941 der Arbeitsgruppe um Amirouchene-Angelozzi et al. [75] dar. In 70% der untersuchten Zellreihen konnte eine gegenüber der jeweiligen Monotherapie signifikant erhöhte Apoptoseinduktion beobachtet werden. Desweiteren zeigte sich durch die duale Inhibition innerhalb der PI3K/AKT/mTOR-Kaskade eine komplette Reduktion des pPRAS40-Levels und folglich der AKT-Aktivierung. Auch hier wurde ein in-vivo Modell bestehend aus zwei PDX (MM52 und MM66) erfolgreich der Kombinationstherapie ausgesetzt, eine durch synergistische Wirkung signifikant erhöhte Tumorregression konnte jeweils aufgezeigt werden.

Das Aderhautmelanom stellt trotz zahlreicher Forschungsbemühungen immer noch eine Erkrankung dar, die im Falle der Metastasierung, unabhängig von der Therapie, innerhalb von Monaten tödlich verläuft. Eine Vielzahl von Wirkstoffen, die eine inhibierende Wirkung auf die MAPK/MEK/ERK und PI3K/AKT/mTOR Kaskaden ausüben, wurde in den letzten Jahren in dieser Indikation untersucht, unter anderem die MEK-Inhibitoren Trametinib und Selumetinib und der mTOR-Inhibitor Everolimus. In unserer Arbeit konnten wir viele Beobachtungen, die über diese Pharmaka in-vitro gemacht wurden, bestätigen und im Vergleich dazu den EGFR-Inhibitor Erlotinib und das Alkylphosphocholin Erufosin als Therapieoptionen einbringen. Erlotinib zeigte aufgrund seiner fehlenden Interaktion mit dem GPCR, wie eingangs erwartet, bescheidene Ergebnisse in-vitro und konnte sich nicht für weitere Fragestellungen in dieser Indikation qualifizieren. Wir konnten jedoch aufzeigen, dass Erufosin signifikante Ergebnisse in-vitro erzielt und sich für weitere Forschungsansätze in diesem Gebiet empfiehlt. In

Gleichklang mit der Tendenz, Therapiemöglichkeiten zu erforschen, die vorrangig in dem Kontext einer kombinierten Inhibitionstherapie agieren, kann der theoretischen Grundlagen und unserer in-vitro Ergebnisse zufolge auch das Alkylphosphocholin Erufosin als weiterer Mitspieler in diesem Kombinationsansatz in Betracht gezogen werden.

Die Kombinationstherapie ist zweifelsfrei der nächste Schritt in Richtung erfolgreiche Therapie der Metastasierung. Für dieses Ziel ist es meiner Ansicht nach essenziell, ein besseres Verständnis der für die Entstehung und Progression der Erkrankung verantwortlichen molekularbiologischen Mechanismen zu entwickeln. Auch die genauen Zusammenhänge zwischen den einzelnen Signalwegen müssen hierfür noch gezielter untersucht werden. Um sich in der Vielzahl der unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten zurechtzufinden und die Qualität der unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten objektiv beurteilen zu können, wäre es empfehlenswert, gemeinsam ein standardisiertes Modell mit gleichen Bedingungen für die unterschiedlichen in-vitro und in-vivo Testungen zu etablieren. Hierbei ist die Wahl der Zellreihen und der PDX-/Xenograft-Modelle relevant, es sollte sich zum einen um Zellen mit GNAQ/GNA11-Mutation und andererseits um Primärtumoren und Zellenreihen mit Metastasenursprung handeln, vorzugsweise Lebermetastasen als häufigste Lokalisation. Die weiter oben beschriebenen Untersuchungen an PDX- oder Xenograft-Modellen waren primärtumoralen Ursprungs, in Zukunft würde sich hier ein Lebermetastasen-Xenograft-Modell empfehlen. Im Anschluss an ausführliche in-vitro und in-vivo Versuche könnten anhand dieses standardisierten Versuchmodells die Kombinationsschemata mit den erfolgversprechendsten Ergebnissen ermittelt und für die weitere Untersuchung in klinischen Studien zur Verfügung gestellt werden, um langfristig ein erfolgreiches Therapieschema für die Behandlung des metastasierten Aderhautmelanoms stellen zu können.

Zusammenfassung

Trotz mehrerer, guter, primärer Therapiemöglichkeiten des Aderhautmelanoms kann bei einer Vielzahl der Patienten im langjährigen Verlauf eine Metastasierung mit einer deutlich eingeschränkten Überlebenszeit beobachtet werden. Im Falle einer Metastasierung gibt es bisher trotz großer Forschungsbemühungen hinsichtlich der Prognoseverbesserung der betroffenen Patienten keine zufriedenstellende Therapie. Es konnten Mutationen im GNAQ- und GNA11-Gen und auf molekulargenetischer Ebene Interaktionen in dem MAPK/MEK/ERK- sowie dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg als wesentliche Bestandteile in der Entstehung und Progression des Aderhautmelanoms identifiziert werden. Diese Targets sind interessante Ziele für die Tumorthherapie. Ziel dieser Arbeit ist es potentielle pharmakologische Wirkstoffe in der Zellkultur hinsichtlich ihrer antitumoralen Wirkung zu untersuchen und zu vergleichen.

Drei Zelllinien von Aderhautmelanom-Metastasen wurden gewählt und der Effekt der Wirkstoffe auf die Viabilität und Proliferation der Zellreihen untersucht. Die Wirkstoffe waren bekannte Inhibitoren der oben genannten Targets. Im MAPK/ERK-Signalweg stellt MEK ein vielversprechendes Target innerhalb der Kaskade dar, hier wurden Selumetinib und Trametinib ausgewählt. Um den Effekt auf den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg zu untersuchen wählten wir den spezifischen mTOR-Inhibitoren Everolimus. Erlotinib stellt einen weiteren, in dieser Fragestellung bisher nicht untersuchten, Wirkstoff dar. Erlotinib ist ein Inhibitor des EGF-Rezeptors, dieser wirkt nach Aktivierung in vielen Melanomarten auf die Signalwege MAPK/MEK/ERK und PI3K/AKT/mTOR. Zuletzt wählten wir das Alkylphosphocholin Erufosin als weiteren am Aderhautmelanom bisher noch nicht untersuchten Wirkstoff aus. Erufosin wird über eine Inhibition von AKT, PKC und Phospholipase-C β eine inhibierende Wirkung auf beide Kaskaden zugeschrieben.

In dieser Arbeit konnte hinsichtlich der MEK-Inhibitoren Selumetinib und Trametinib eine signifikante Hemmung des Zellwachstums sowie eine Reduktion der Zellviabilität beobachtet werden. Auch der mTOR-Inhibitor Everolimus konnte einen signifikanten antiproliferativen Effekt nachweisen, eine Reduktion des Zellüberlebens im Sinne einer zytotoxischen Wirkung konnte nicht beobachtet werden. Auch das Alkylphosphocholin Erufosin zeigte eine signifikante Reduktion der Zellzahl in-vitro, zudem zeigte Erufosin als einziger Wirkstoff einen signifikanten Anstieg des Anteils toter Zellen an der Gesamtzellzahl im

viabilitätsreduzierenden Konzentrationsbereich. Eine proliferationshemmende Wirkung konnte in dem untersuchten Konzentrationsspektrum nicht beobachtet werden.

Anhand der Versuche in dieser Arbeit lässt sich die Wirkung der Wirkstoffe auf die Proliferation und Zellviabilität untersuchen. Allerdings erlaubt dieser Versuchsaufbau keine Beurteilung der genaueren molekularbiologischen Mechanismen, die für die Reduktion der Zellviabilität verantwortlich sind, sodass sich der direkte Nachweis apoptotischer Abläufe in weiteren Untersuchungen anbieten würde. Dieser Fragestellung wurde unter anderem mit Selumetinib, Trametinib und Everolimus in mehreren Publikationen nachgegangen. Trotz der bereits beschriebenen Hemmung des Zellwachstums und der Reduktion der Zellviabilität stellte sich hier kein Anhaltspunkt für eine Apoptoseeinleitung in den untersuchten Zelllinien dar. Die eingeschränkte Wirkung der Wirkstoffe in der Monotherapie lässt sich am ehesten auf verschiedene Feedback-Mechanismen innerhalb der Kaskade, Kreuzaktivierungen zwischen den einzelnen Signalwegen sowie auf eine Resistenzbildung zurückführen, sodass sich zuletzt die Kombinationstherapie aus mehreren unterschiedlichen Wirkstoffen als neuer Therapieansatz hervorgetan hat. Die Kombinationstherapie ist ein vielversprechender Ansatz in der Entwicklung einer erfolgreichen Therapie des metastasierten Aderhautmelanoms und sollte zusammen mit der gezielten Erforschung der genaueren molekularbiologischen Mechanismen in der Entstehung und Progression des Aderhautmelanoms Schwerpunkt zukünftiger Forschungsarbeiten sein.

Literaturverzeichnis

1. Welsch, U. and J. Sobotta, *Lehrbuch Histologie Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie; mit 21 Tabellen*. 1. Aufl. ed. 2003, München Jena: Urban & Fischer. IX, 598 S.
2. Chang, A.E., L.H. Karnell, and H.R. Menck, *The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society*. Cancer, 1998. **83**(8): p. 1664-78.
3. Singh, A.D., M.E. Turell, and A.K. Topham, *Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival*. Ophthalmology, 2011. **118**(9): p. 1881-5.
4. van den Bosch, T., et al., *Genetics of uveal melanoma and cutaneous melanoma: two of a kind?* Dermatol Res Pract, 2010. **2010**: p. 360136.
5. Singh, A.D. and A. Topham, *Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973-1997*. Ophthalmology, 2003. **110**(5): p. 956-61.
6. Virgili, G., et al., *Incidence of uveal melanoma in Europe*. Ophthalmology, 2007. **114**(12): p. 2309-15.
7. Singh, A.D., L. Bergman, and S. Seregard, *Uveal melanoma: epidemiologic aspects*. Ophthalmol Clin North Am, 2005. **18**(1): p. 75-84, viii.
8. Bastian, B.C., *The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 239-71.
9. Shields, C.L., et al., *Clinical spectrum and prognosis of uveal melanoma based on age at presentation in 8,033 cases*. Retina, 2012. **32**(7): p. 1363-72.
10. McLean, I.W., et al., *Modifications of Callender's classification of uveal melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology*. Am J Ophthalmol, 1983. **96**(4): p. 502-9.
11. Schmitt, A., et al., *Independent prognostic factors for distant metastases and survival in patients with primary uveal melanoma*. Eur J Cancer, 2004. **40**(16): p. 2389-95.
12. Shamma, H.F. and F.C. Blodi, *Prognostic factors in choroidal and ciliary body melanomas*. Arch Ophthalmol, 1977. **95**(1): p. 63-9.
13. Shields, C.L., et al., *Iris melanoma: features and prognosis in 317 children and adults*. J aapos, 2012. **16**(1): p. 10-6.
14. Diener-West, M., et al., *Development of metastatic disease after enrollment in the COMS trials for treatment of choroidal melanoma: Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report No. 26*. Arch Ophthalmol, 2005. **123**(12): p. 1639-43.
15. Kujala, E., T. Makitie, and T. Kivela, *Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(11): p. 4651-9.
16. *Assessment of metastatic disease status at death in 435 patients with large choroidal melanoma in the Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS): COMS report no. 15*. Arch Ophthalmol, 2001. **119**(5): p. 670-6.
17. Augsburger, J.J., Z.M. Correa, and A.H. Shaikh, *Effectiveness of treatments for metastatic uveal melanoma*. Am J Ophthalmol, 2009. **148**(1): p. 119-27.
18. Rietschel, P., et al., *Variates of survival in metastatic uveal melanoma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(31): p. 8076-80.
19. Seddon, J.M., et al., *Host factors, UV radiation, and risk of uveal melanoma. A case-control study*. Arch Ophthalmol, 1990. **108**(9): p. 1274-80.

20. Smith, J.H., et al., *Genetic study of familial uveal melanoma: association of uveal and cutaneous melanoma with cutaneous and ocular nevi*. Ophthalmology, 2007. **114**(4): p. 774-9.
21. Weis, E., et al., *The association between host susceptibility factors and uveal melanoma: a meta-analysis*. Arch Ophthalmol, 2006. **124**(1): p. 54-60.
22. Mudhar, H.S., et al., *A critical appraisal of the prognostic and predictive factors for uveal malignant melanoma*. Histopathology, 2004. **45**(1): p. 1-12.
23. Singh, A.D., et al., *Sunlight exposure and pathogenesis of uveal melanoma*. Surv Ophthalmol, 2004. **49**(4): p. 419-28.
24. *Factors predictive of growth and treatment of small choroidal melanoma: COMS Report No. 5. The Collaborative Ocular Melanoma Study Group*. Arch Ophthalmol, 1997. **115**(12): p. 1537-44.
25. White, V.A., et al., *Correlation of cytogenetic abnormalities with the outcome of patients with uveal melanoma*. Cancer, 1998. **83**(2): p. 354-9.
26. Kath, R., et al., *Prognosis and treatment of disseminated uveal melanoma*. Cancer, 1993. **72**(7): p. 2219-23.
27. Chattopadhyay, C., E.A. Grimm, and S.E. Woodman, *Simultaneous inhibition of the HGF/MET and Erk1/2 pathways affect uveal melanoma cell growth and migration*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e83957.
28. Patel, S.P., *Latest developments in the biology and management of uveal melanoma*. Curr Oncol Rep, 2013. **15**(6): p. 509-16.
29. Pereira, P.R., et al., *Current and emerging treatment options for uveal melanoma*. Clin Ophthalmol, 2013. **7**: p. 1669-82.
30. Luke, J.J., et al., *Clinical activity of ipilimumab for metastatic uveal melanoma: a retrospective review of the Dana-Farber Cancer Institute, Massachusetts General Hospital, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, and University Hospital of Lausanne experience*. Cancer, 2013. **119**(20): p. 3687-95.
31. Diener-West, M., et al., *A review of mortality from choroidal melanoma. II. A meta-analysis of 5-year mortality rates following enucleation, 1966 through 1988*. Arch Ophthalmol, 1992. **110**(2): p. 245-50.
32. Damato, B. and S.E. Coupland, *A reappraisal of the significance of largest basal diameter of posterior uveal melanoma*. Eye (Lond), 2009. **23**(12): p. 2152-60; quiz 2161-2.
33. Shields, C.L., et al., *Metastasis of uveal melanoma millimeter-by-millimeter in 8033 consecutive eyes*. Arch Ophthalmol, 2009. **127**(8): p. 989-98.
34. *Histopathologic characteristics of uveal melanomas in eyes enucleated from the Collaborative Ocular Melanoma Study. COMS report no. 6. Am J Ophthalmol*, 1998. **125**(6): p. 745-66.
35. Krantz, B.A., et al., *Uveal melanoma: epidemiology, etiology, and treatment of primary disease*. Clin Ophthalmol, 2017. **11**: p. 279-289.
36. McLean, I.W., L.E. Zimmerman, and W.D. Foster, *Survival rates after enucleation of eyes with malignant melanoma*. Am J Ophthalmol, 1979. **88**(4): p. 794-7.
37. Lommatzsch, P. and R. Vollmar, *A new way in the conservative therapy of intraocular tumors by means of beta-irradiation (Ruthenium 106) with preservation of vision*. Klin Monbl Augenheilkd, 1966. **148**(5): p. 682-99.
38. *The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma: V. Twelve-year mortality rates and prognostic factors: COMS report No. 28. Arch Ophthalmol*, 2006. **124**(12): p. 1684-93.

39. Muacevic, A., et al., *Development of a streamlined, non-invasive robotic radiosurgery method for treatment of uveal melanoma*. Technol Cancer Res Treat, 2008. **7**(5): p. 369-74.
40. Logani, S., et al., *Gamma Knife radiosurgery in the treatment of ocular melanoma*. Stereotact Funct Neurosurg, 1993. **61 Suppl 1**: p. 38-44.
41. Marchini, G., et al., *Stereotactic radiosurgery of uveal melanomas: preliminary results with Gamma Knife treatment*. Stereotact Funct Neurosurg, 1995. **64 Suppl 1**: p. 72-9.
42. Gragoudas, E.S., et al., *Proton beam irradiation. An alternative to enucleation for intraocular melanomas*. Ophthalmology, 1980. **87**(6): p. 571-81.
43. Bechrakis, N.E., et al., *Iodine 125 plaque brachytherapy versus transscleral tumor resection in the treatment of large uveal melanomas*. Ophthalmology, 2002. **109**(10): p. 1855-61.
44. Bensoussan, E., et al., *Outcomes After Proton Beam Therapy for Large Choroidal Melanomas in 492 Patients*. Am J Ophthalmol, 2016. **165**: p. 78-87.
45. Foulds, W.S., *The local excision of choroidal melanomata*. Trans Ophthalmol Soc U K, 1973. **93**(0): p. 343-6.
46. Naor, Z., O. Benard, and R. Seger, *Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor*. Trends Endocrinol Metab, 2000. **11**(3): p. 91-9.
47. Neves, S.R., P.T. Ram, and R. Iyengar, *G protein pathways*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1636-9.
48. Landis, C.A., et al., *GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours*. Nature, 1989. **340**(6236): p. 692-6.
49. Markby, D.W., R. Onrust, and H.R. Bourne, *Separate GTP binding and GTPase activating domains of a G alpha subunit*. Science, 1993. **262**(5141): p. 1895-901.
50. Johansson, P., et al., *Deep sequencing of uveal melanoma identifies a recurrent mutation in PLCB4*. Oncotarget, 2016. **7**(4): p. 4624-31.
51. Mellor, H. and P.J. Parker, *The extended protein kinase C superfamily*. Biochem J, 1998. **332 (Pt 2)**: p. 281-92.
52. Newton, A.C., *Regulation of protein kinase C*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 161-7.
53. Alessi, D.R., et al., *Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1*. Embo j, 1994. **13**(7): p. 1610-9.
54. Ambrosini, G., et al., *Identification of unique MEK-dependent genes in GNAQ mutant uveal melanoma involved in cell growth, tumor cell invasion, and MEK resistance*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(13): p. 3552-61.
55. Khalili, J.S., et al., *Combination small molecule MEK and PI3K inhibition enhances uveal melanoma cell death in a mutant GNAQ- and GNA11-dependent manner*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(16): p. 4345-55.
56. Ho, A.L., et al., *Impact of combined mTOR and MEK inhibition in uveal melanoma is driven by tumor genotype*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40439.
57. Mendoza, M.C., E.E. Er, and J. Blenis, *The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(6): p. 320-8.
58. Jeffrey, K.L., et al., *Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(5): p. 391-403.
59. Vidwans, S.J., et al., *A melanoma molecular disease model*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e18257.
60. Yoon, S. and R. Seger, *The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions*. Growth Factors, 2006. **24**(1): p. 21-44.

61. Gille, H., A.D. Sharrocks, and P.E. Shaw, *Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter*. Nature, 1992. **358**(6385): p. 414-7.
62. Buchwalter, G., C. Gross, and B. Wasylyk, *Ets ternary complex transcription factors*. Gene, 2004. **324**: p. 1-14.
63. Wu, X., et al., *Protein kinase C inhibitor AEB071 targets ocular melanoma harboring GNAQ mutations via effects on the PKC/Erk1/2 and PKC/NF-kappaB pathways*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(9): p. 1905-14.
64. Roskoski, R., Jr., *ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation*. Pharmacol Res, 2012. **66**(2): p. 105-43.
65. Chana, J.S., et al., *c-myc, p53, and Bcl-2 expression and clinical outcome in uveal melanoma*. Br J Ophthalmol, 1999. **83**(1): p. 110-4.
66. Dhillon, A.S., et al., *MAP kinase signalling pathways in cancer*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3279-90.
67. Lin, L.L., et al., *cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase*. Cell, 1993. **72**(2): p. 269-78.
68. Roux, P.P. and J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 320-44.
69. Sturgill, T.W., et al., *Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II*. Nature, 1988. **334**(6184): p. 715-8.
70. Deak, M., et al., *Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB*. Embo j, 1998. **17**(15): p. 4426-41.
71. Fukunaga, R. and T. Hunter, *MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates*. Embo j, 1997. **16**(8): p. 1921-33.
72. Waskiewicz, A.J., et al., *Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2*. Embo j, 1997. **16**(8): p. 1909-20.
73. Coupland, S.E., et al., *Expression patterns of cyclin D1 and related proteins regulating G1-S phase transition in uveal melanoma and retinoblastoma*. Br J Ophthalmol, 1998. **82**(8): p. 961-70.
74. Burgering, B.M. and R.H. Medema, *Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(6): p. 689-701.
75. Amirouchene-Angelozzi, N., et al., *The mTOR inhibitor Everolimus synergizes with the PI3K inhibitor GDC0941 to enhance anti-tumor efficacy in uveal melanoma*. Oncotarget, 2016. **7**(17): p. 23633-46.
76. Wymann, M.P., et al., *Phosphoinositide 3-kinase gamma: a key modulator in inflammation and allergy*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 1): p. 275-80.
77. Cerne, J.Z., et al., *Protein kinase C inhibitors sensitize GNAQ mutant uveal melanoma cells to ionizing radiation*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. **55**(4): p. 2130-9.
78. Saraiva, V.S., et al., *Immunohistochemical expression of phospho-Akt in uveal melanoma*. Melanoma Res, 2005. **15**(4): p. 245-50.
79. Kandel, E.S. and N. Hay, *The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB*. Exp Cell Res, 1999. **253**(1): p. 210-29.
80. Manning, B.D., et al., *Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway*. Mol Cell, 2002. **10**(1): p. 151-62.

81. Carita, G., et al., *Dual inhibition of protein kinase C and p53-MDM2 or PKC and mTORC1 are novel efficient therapeutic approaches for uveal melanoma*. *Oncotarget*, 2016: p. 33542-33556.
82. Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley, *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism*. *Nat Rev Genet*, 2006. **7**(8): p. 606-19.
83. Zoncu, R., A. Efeyan, and D.M. Sabatini, *mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(1): p. 21-35.
84. Yan, F., et al., *Elucidating the role of the FoxO3a transcription factor in the IGF-1-induced migration and invasion of uveal melanoma cancer cells*. *Biomed Pharmacother*, 2016. **84**: p. 1538-1550.
85. Coupland, S.E., et al., *The prognostic value of cyclin D1, p53, and MDM2 protein expression in uveal melanoma*. *J Pathol*, 2000. **191**(2): p. 120-6.
86. Brantley, M.A., Jr. and J.W. Harbour, *Deregulation of the Rb and p53 pathways in uveal melanoma*. *Am J Pathol*, 2000. **157**(6): p. 1795-801.
87. Griewank, K.G., et al., *Genetic and molecular characterization of uveal melanoma cell lines*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2012. **25**(2): p. 182-7.
88. Weber, A., et al., *Absence of mutations of the BRAF gene and constitutive activation of extracellular-regulated kinase in malignant melanomas of the uvea*. *Lab Invest*, 2003. **83**(12): p. 1771-6.
89. Cruz, F., 3rd, et al., *Absence of BRAF and NRAS mutations in uveal melanoma*. *Cancer Res*, 2003. **63**(18): p. 5761-6.
90. Zuidervaart, W., et al., *Activation of the MAPK pathway is a common event in uveal melanomas although it rarely occurs through mutation of BRAF or RAS*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(11): p. 2032-8.
91. Mooy, C.M., et al., *No N-ras mutations in human uveal melanoma: the role of ultraviolet light revisited*. *Br J Cancer*, 1991. **64**(2): p. 411-3.
92. Soparker, C.N., J.M. O'Brien, and D.M. Albert, *Investigation of the role of the ras protooncogene point mutation in human uveal melanomas*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993. **34**(7): p. 2203-9.
93. Pache, M., et al., *Sequence analysis and high-throughput immunohistochemical profiling of KIT (CD 117) expression in uveal melanoma using tissue microarrays*. *Virchows Arch*, 2003. **443**(6): p. 741-4.
94. An, J., et al., *A comparative transcriptomic analysis of uveal melanoma and normal uveal melanocyte*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e16516.
95. Onken, M.D., et al., *Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008. **49**(12): p. 5230-4.
96. Van Raamsdonk, C.D., et al., *Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi*. *Nature*, 2009. **457**(7229): p. 599-602.
97. Van Raamsdonk, C.D., et al., *Mutations in GNA11 in uveal melanoma*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(23): p. 2191-9.
98. Coupland, S.E., et al., *Molecular pathology of uveal melanoma*. *Eye (Lond)*, 2013. **27**(2): p. 230-42.
99. Kalinec, G., et al., *Mutated alpha subunit of the Gq protein induces malignant transformation in NIH 3T3 cells*. *Mol Cell Biol*, 1992. **12**(10): p. 4687-93.
100. Sondek, J., et al., *GTPase mechanism of Gproteins from the 1.7-A crystal structure of transducin alpha-GDP-AIF-4*. *Nature*, 1994. **372**(6503): p. 276-9.
101. O'Hayre, M., et al., *The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(6): p. 412-24.

102. Ambrosini, G., et al., *Inhibition of mutant GNAQ signaling in uveal melanoma induces AMPK-dependent autophagic cell death*. Mol Cancer Ther, 2013. **12**(5): p. 768-76.
103. Sagoo, M.S., et al., *Combined PKC and MEK inhibition for treating metastatic uveal melanoma*. Oncogene, 2014. **33**(39): p. 4722-3.
104. Patel, M., et al., *Therapeutic implications of the emerging molecular biology of uveal melanoma*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(8): p. 2087-100.
105. Harbour, J.W., *The genetics of uveal melanoma: an emerging framework for targeted therapy*. Pigment Cell Melanoma Res, 2012. **25**(2): p. 171-81.
106. Harbour, J.W., et al., *Recurrent mutations at codon 625 of the splicing factor SF3B1 in uveal melanoma*. Nat Genet, 2013. **45**(2): p. 133-5.
107. Martin, M., et al., *Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3*. Nat Genet, 2013. **45**(8): p. 933-6.
108. Dono, M., et al., *Mutation frequencies of GNAQ, GNA11, BAP1, SF3B1, EIF1AX and TERT in uveal melanoma: detection of an activating mutation in the TERT gene promoter in a single case of uveal melanoma*. Br J Cancer, 2014. **110**(4): p. 1058-65.
109. Harbour, J.W., et al., *Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas*. Science, 2010. **330**(6009): p. 1410-3.
110. Jensen, D.E., et al., *BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression*. Oncogene, 1998. **16**(9): p. 1097-112.
111. Nishikawa, H., et al., *BRCA1-associated protein 1 interferes with BRCA1/BARD1 RING heterodimer activity*. Cancer Res, 2009. **69**(1): p. 111-9.
112. Matatall, K.A., et al., *BAP1 deficiency causes loss of melanocytic cell identity in uveal melanoma*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 371.
113. Ladanyi, M., et al., *New strategies in pleural mesothelioma: BAP1 and NF2 as novel targets for therapeutic development and risk assessment*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(17): p. 4485-90.
114. Luke, J.J., et al., *Biology of advanced uveal melanoma and next steps for clinical therapeutics*. Pigment Cell Melanoma Res, 2015. **28**(2): p. 135-47.
115. Salmon, R.J., et al., *Treatment of liver metastases from uveal melanoma by combined surgery-chemotherapy*. Eur J Surg Oncol, 1998. **24**(2): p. 127-30.
116. Yonekawa, Y. and I.K. Kim, *Epidemiology and management of uveal melanoma*. Hematol Oncol Clin North Am, 2012. **26**(6): p. 1169-84.
117. Carvajal, R.D., et al., *Effect of selumetinib vs chemotherapy on progression-free survival in uveal melanoma: a randomized clinical trial*. Jama, 2014. **311**(23): p. 2397-405.
118. Dummer, R., et al., *Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2012. **23 Suppl 7**: p. vii86-91.
119. Bedikian, A.Y., et al., *Phase II evaluation of temozolomide in metastatic choroidal melanoma*. Melanoma Res, 2003. **13**(3): p. 303-6.
120. Honsi, J., et al., *Phase 2 open-label study of weekly docosahexaenoic acid-paclitaxel in patients with metastatic uveal melanoma*. Melanoma Res, 2010. **20**(6): p. 507-10.
121. Kivela, T., et al., *Bleomycin, vincristine, lomustine and dacarbazine (BOLD) in combination with recombinant interferon alpha-2b for metastatic uveal melanoma*. Eur J Cancer, 2003. **39**(8): p. 1115-20.
122. O'Neill, P.A., et al., *A prospective single arm phase II study of dacarbazine and treosulfan as first-line therapy in metastatic uveal melanoma*. Melanoma Res, 2006. **16**(3): p. 245-8.

123. Schmidt-Hieber, M., et al., *A phase II study of bendamustine chemotherapy as second-line treatment in metastatic uveal melanoma*. Melanoma Res, 2004. **14**(6): p. 439-42.
124. Schmittle, A., et al., *Phase II trial of cisplatin, gemcitabine and treosulfan in patients with metastatic uveal melanoma*. Melanoma Res, 2005. **15**(3): p. 205-7.
125. Spagnolo, F., et al., *Treatment of metastatic uveal melanoma with intravenous fotemustine*. Melanoma Res, 2013. **23**(3): p. 196-8.
126. Maio, M., et al., *Efficacy and safety of ipilimumab in patients with pre-treated, uveal melanoma*. Ann Oncol, 2013. **24**(11): p. 2911-5.
127. Zimmer, L., et al., *Phase II DeCOG-study of ipilimumab in pretreated and treatment-naïve patients with metastatic uveal melanoma*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0118564.
128. Woll, E., A. Bedikian, and S.S. Legha, *Uveal melanoma: natural history and treatment options for metastatic disease*. Melanoma Res, 1999. **9**(6): p. 575-81.
129. Desjardins, L., et al., *[Prognostic factors for malignant uveal melanoma. Retrospective study on 2,241 patients and recent contribution of monosomy-3 research]*. J Fr Ophtalmol, 2006. **29**(7): p. 741-9.
130. Rivoire, M., et al., *Treatment of liver metastases from uveal melanoma*. Ann Surg Oncol, 2005. **12**(6): p. 422-8.
131. Brasiuniene, B., et al., *Combined treatment of uveal melanoma liver metastases*. Eur J Med Res, 2011. **16**(2): p. 71-5.
132. Logan, P., J. Burnier, and M.N. Burnier, Jr., *Vascular endothelial growth factor expression and inhibition in uveal melanoma cell lines*. Ecancermedicallscience, 2013. **7**: p. 336.
133. Penel, N., et al., *O-Mel-Inib: a Cancero-pole Nord-Ouest multicenter phase II trial of high-dose imatinib mesylate in metastatic uveal melanoma*. Invest New Drugs, 2008. **26**(6): p. 561-5.
134. Mahipal, A., et al., *A pilot study of sunitinib malate in patients with metastatic uveal melanoma*. Melanoma Res, 2012. **22**(6): p. 440-6.
135. Bhatia, S., et al., *Phase II trial of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with metastatic uveal melanoma: SWOG S0512*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e48787.
136. Tarhini, A.A., et al., *Aflibercept (VEGF Trap) in inoperable stage III or stage iv melanoma of cutaneous or uveal origin*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(20): p. 6574-81.
137. Carvajal, R.D., et al., *Metastatic disease from uveal melanoma: treatment options and future prospects*. Br J Ophthalmol, 2016.
138. Kim, D.W. and S.P. Patel, *Profile of selumetinib and its potential in the treatment of melanoma*. Onco Targets Ther, 2014. **7**: p. 1631-9.
139. Yeh, T.C., et al., *Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(5): p. 1576-83.
140. ClinicalTrials.gov. *Selumetinib in Treating Patients With Recurrent or Persistent Endometrial Cancer*. 2009 [cited 2017 14 Mar]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01011933?term=NCT01011933&rank=1>.
141. ClinicalTrials.gov. *AZD6244 (Selumetinib) in Treating Patients With Multiple Myeloma*. 2010 [cited 2017 14 Mar]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01085214?term=NCT01085214&rank=1>.
142. ClinicalTrials.gov. *Selumetinib in Treating Patients With Recurrent or Refractory Acute Myeloid Leukemia*. 2007 [cited 2017 14 Mar]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00588809?term=NCT00588809&rank=1>.

143. ClinicalTrials.gov. *Selumetinib and Cyclosporine in Treating Patients With Advanced Solid Tumors or Advanced or Metastatic Colorectal Cancer*. 2014 [cited 2017 14 Mar]; Available from:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02188264?term=NCT02188264&rank=1>.
144. ClinicalTrials.gov. *Selumetinib and Paclitaxel as Second-Line Treatment in Treating Patients With Stage IIIB-IV Non-small Cell Lung Cancer*. 2015 [cited 2017 14 Mar]; Available from:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02503358?term=NCT02503358&rank=1>.
145. ClinicalTrials.gov. *Iodine I-131 With or Without Selumetinib in Treating Patients With Recurrent or Metastatic Thyroid Cancer*. 2015 [cited 2017 14 Mar]; Available from:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02393690?term=NCT02393690&rank=1>.
146. Agency, E.M. *Mekinist*. 28 Sep 2016 [cited 2017 14 Mar]; Available from:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002643/human_med_001772.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
147. ClinicalTrials.gov. *Trametinib in Treating Patients With Recurrent or Progressive Low-Grade Ovarian Cancer or Peritoneal Cavity Cancer*. 2014 [cited 2017 14 Mar]; Available from:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02101788?term=low+grade+ovarian+trametinib&rank=1>.
148. ClinicalTrials.gov. *GSK1120212+GSK2141795 for Cervical Cancer*. 2013 [cited 2017 14 Mar]; Available from:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01958112?term=NCT01958112&rank=1>.
149. ClinicalTrials.gov. *Trametinib in Increasing Tumoral Iodine Incorporation in Patients With Recurrent or Metastatic Thyroid Cancer*. 2014 [cited 2017 14 Mar]; Available from:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02152995?term=NCT02152995&rank=1>.
150. ClinicalTrials.gov. *Trametinib and Docetaxel in Treating Patients With Recurrent or Stage IV KRAS Mutation Positive Non-small Cell Lung Cancer*. 2015 [cited 2017 14 Mar]; Available from:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02642042?term=NCT02642042&rank=1>.
151. ClinicalTrials.gov. *Study of GSK1120212 Plus Gemcitabine vs Placebo Plus Gemcitabine in Metastatic Pancreatic Cancer*. 2010 [cited 2017 14 Mar]; Available from:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01231581?term=NCT01231581&rank=1>.
152. ClinicalTrials.gov. *Trametinib and Akt Inhibitor GSK2141795 in Treating Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer*. 2013 [cited 2017 14 Mar]; Available from:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01964924?term=NCT01964924&rank=1>.
153. ClinicalTrials.gov. *A Trial of Trametinib and Panitumumab in RAS/RAF Wild Type Advanced Colorectal Cancer*. 2015 [cited 2017 14 Mar]; Available from:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02399943?term=NCT02399943&rank=1>.
154. Chapman, T.M. and C.M. Perry, *Everolimus*. *Drugs*, 2004. **64**(8): p. 861-72; discussion 873-4.
155. ClinicalTrials.gov. *Afinitor*. 21 Jul 2016 [cited 2017 14 Mar]; Available from:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/001038/human_med_000633.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
156. Dowell, J., J.D. Minna, and P. Kirkpatrick, *Erlotinib hydrochloride*. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. **4**(1): p. 13-4.

157. Raymond, E., S. Faivre, and J.P. Armand, *Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy*. Drugs, 2000. **60 Suppl 1**: p. 15-23; discussion 41-2.
158. Azuma, K., et al., *Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer*. Ann Oncol, 2014. **25**(10): p. 1935-40.
159. Chen, N., et al., *Upregulation of PD-L1 by EGFR Activation Mediates the Immune Escape in EGFR-Driven NSCLC: Implication for Optional Immune Targeted Therapy for NSCLC Patients with EGFR Mutation*. J Thorac Oncol, 2015. **10**(6): p. 910-23.
160. Ota, K., et al., *Induction of PD-L1 Expression by the EML4-ALK Oncoprotein and Downstream Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(17): p. 4014-21.
161. Cohen, M.H., et al., *Approval summary: erlotinib maintenance therapy of advanced/metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC)*. Oncologist, 2010. **15**(12): p. 1344-51.
162. Heeger, S., *Targeted therapy of the epidermal growth factor receptor in the treatment of pancreatic cancer*. Recent Results Cancer Res, 2008. **177**: p. 131-6.
163. Berger, M.R., et al., *New cytostatics with experimentally different toxic profiles*. Cancer Treat Rev, 1987. **14**(3-4): p. 307-17.
164. Eibl, H. and J. Engel, *Synthesis of hexadecylphosphocholine (miltefosine)*. Prog Exp Tumor Res, 1992. **34**: p. 1-5.
165. Jendrossek, V., et al., *Structure-activity relationships of alkylphosphocholine derivatives: antineoplastic action on brain tumor cell lines in vitro*. Cancer Chemother Pharmacol, 2002. **50**(1): p. 71-9.
166. Bagley, R.G., et al., *Erufosine, an alkylphosphocholine, with differential toxicity to human cancer cells and bone marrow cells*. Cancer Chemother Pharmacol, 2011. **68**(6): p. 1537-46.
167. Yosifov, D.Y., et al., *Erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium (erufosine) is a potential antimyeloma drug devoid of myelotoxicity*. Cancer Chemother Pharmacol, 2011. **67**(1): p. 13-25.
168. Dineva, I.K., et al., *Erufosine suppresses breast cancer in vitro and in vivo for its activity on PI3K, c-Raf and Akt proteins*. J Cancer Res Clin Oncol, 2012. **138**(11): p. 1909-17.
169. Gills, J.J. and P.A. Dennis, *Perifosine: update on a novel Akt inhibitor*. Curr Oncol Rep, 2009. **11**(2): p. 102-10.
170. Hideshima, T., et al., *Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells*. Blood, 2006. **107**(10): p. 4053-62.
171. Kondapaka, S.B., et al., *Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation*. Mol Cancer Ther, 2003. **2**(11): p. 1093-103.
172. Li, Z., et al., *In vitro and in vivo inhibition of neuroblastoma tumor cell growth by AKT inhibitor perifosine*. J Natl Cancer Inst, 2010. **102**(11): p. 758-70.
173. Richardson, P.G., et al., *Perifosine, an oral, anti-cancer agent and inhibitor of the Akt pathway: mechanistic actions, pharmacodynamics, pharmacokinetics, and clinical activity*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2012. **8**(5): p. 623-33.
174. Pauig, S.B. and L.W. Daniel, *Protein kinase C inhibition by ET-18-OCH3 and related analogs. A target for cancer chemotherapy*. Adv Exp Med Biol, 1996. **416**: p. 173-80.
175. Goekjian, P.G. and M.R. Jirousek, *Protein kinase C inhibitors as novel anticancer drugs*. Expert Opin Investig Drugs, 2001. **10**(12): p. 2117-40.

176. Powis, G., et al., *Selective inhibition of phosphatidylinositol phospholipase C by cytotoxic ether lipid analogues*. Cancer Res, 1992. **52**(10): p. 2835-40.
177. Grunicke, H.H., et al., *Cellular signalling as a target in cancer chemotherapy. Phospholipid analogues as inhibitors of mitogenic signal transduction*. Adv Enzyme Regul, 1996. **36**: p. 385-407.
178. Strassheim, D., et al., *Small cell lung carcinoma exhibits greater phospholipase C-beta1 expression and edelfosine resistance compared with non-small cell lung carcinoma*. Cancer Res, 2000. **60**(10): p. 2730-6.
179. Zhou, X., et al., *1-O-octadecyl-2-O-methyl-glycerophosphocholine inhibits the transduction of growth signals via the MAPK cascade in cultured MCF-7 cells*. J Clin Invest, 1996. **98**(4): p. 937-44.
180. Orth, J.H., et al., *Pasteurella multocida toxin activation of heterotrimeric G proteins by deamidation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(17): p. 7179-84.
181. Spitzer, M.S., et al., *Comparative antiproliferative and cytotoxic profile of bevacizumab (Avastin), pegaptanib (Macugen) and ranibizumab (Lucentis) on different ocular cells*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2007. **245**(12): p. 1837-42.
182. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
183. Benov, L. and I. Fridovich, *Is reduction of the sulfonated tetrazolium 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2-tetrazolium 5-carboxanilide a reliable measure of intracellular superoxide production?* Anal Biochem, 2002. **310**(2): p. 186-90.
184. Darzynkiewicz, Z., et al., *Features of apoptotic cells measured by flow cytometry*. Cytometry, 1992. **13**(8): p. 795-808.
185. Neubig, R.R., et al., *International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology*. Pharmacol Rev, 2003. **55**(4): p. 597-606.
186. Sebaugh, J.L., *Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation*. Pharm Stat, 2011. **10**(2): p. 128-34.
187. Amirouchene-Angelozi, N., et al., *Establishment of novel cell lines recapitulating the genetic landscape of uveal melanoma and preclinical validation of mTOR as a therapeutic target*. Mol Oncol, 2014. **8**(8): p. 1508-20.
188. Davies, B.R., et al., *AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 kinases: mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical models*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(8): p. 2209-19.
189. Mitsiades, N., et al., *Genotype-dependent sensitivity of uveal melanoma cell lines to inhibition of B-Raf, MEK, and Akt kinases: rationale for personalized therapy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(10): p. 7248-55.
190. Weigelt, B., P.H. Warne, and J. Downward, *PIK3CA mutation, but not PTEN loss of function, determines the sensitivity of breast cancer cells to mTOR inhibitory drugs*. Oncogene, 2011. **30**(29): p. 3222-33.
191. Ranson, M., et al., *A phase I dose-escalation and bioavailability study of oral and intravenous formulations of erlotinib (Tarceva, OSI-774) in patients with advanced solid tumors of epithelial origin*. Cancer Chemother Pharmacol, 2010. **66**(1): p. 53-8.
192. Pollack, V.A., et al., *Inhibition of epidermal growth factor receptor-associated tyrosine phosphorylation in human carcinomas with CP-358,774: dynamics of receptor inhibition in situ and antitumor effects in athymic mice*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **291**(2): p. 739-48.

193. Zaharieva, M.M., et al., *Erufosine: a membrane targeting antineoplastic agent with signal transduction modulating effects*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1095**: p. 182-92.
194. Fiegl, M., et al., *Erufosine, a novel alkylphosphocholine, in acute myeloid leukemia: single activity and combination with other antileukemic drugs*. Cancer Chemother Pharmacol, 2008. **62**(2): p. 321-9.
195. Martelli, A.M., et al., *Erucylphosphohomocholine, the first intravenously applicable alkylphosphocholine, is cytotoxic to acute myelogenous leukemia cells through JNK- and PP2A-dependent mechanisms*. Leukemia, 2010. **24**(4): p. 687-98.
196. Konigs, S.K., et al., *Erufosine, a novel alkylphosphocholine, induces apoptosis in CLL through a caspase-dependent pathway*. Leuk Res, 2010. **34**(8): p. 1064-9.
197. Yosifov, D.Y., et al., *Interleukin-6, osteopontin and Raf/MEK/ERK signaling modulate the sensitivity of human myeloma cells to alkylphosphocholines*. Leuk Res, 2012. **36**(6): p. 764-72.
198. Konstantinov, S.M. and M.R. Berger, *Human urinary bladder carcinoma cell lines respond to treatment with alkylphosphocholines*. Cancer Lett, 1999. **144**(2): p. 153-60.
199. Kapoor, V., et al., *Erufosine simultaneously induces apoptosis and autophagy by modulating the Akt-mTOR signaling pathway in oral squamous cell carcinoma*. Cancer Lett, 2012. **319**(1): p. 39-48.
200. Chen, M.B., et al., *Perifosine sensitizes curcumin-induced anti-colorectal cancer effects by targeting multiple signaling pathways both in vivo and in vitro*. Int J Cancer, 2012. **131**(11): p. 2487-98.
201. Lemeshko, V.V. and W. Kugler, *Synergistic inhibition of mitochondrial respiration by anticancer agent erucylphosphohomocholine and cyclosporin A*. J Biol Chem, 2007. **282**(52): p. 37303-7.
202. Rubel, A., et al., *The membrane targeted apoptosis modulators erucylphosphocholine and erucylphosphohomocholine increase the radiation response of human glioblastoma cell lines in vitro*. Radiat Oncol, 2006. **1**: p. 6.
203. Veenman, L., et al., *Potential involvement of FOF1-ATP(synth)ase and reactive oxygen species in apoptosis induction by the antineoplastic agent erucylphosphohomocholine in glioblastoma cell lines : a mechanism for induction of apoptosis via the 18 kDa mitochondrial translocator protein*. Apoptosis, 2010. **15**(7): p. 753-68.
204. Rudner, J., et al., *The Akt-inhibitor Erufosine induces apoptotic cell death in prostate cancer cells and increases the short term effects of ionizing radiation*. Radiat Oncol, 2010. **5**: p. 108.
205. Berger, M.R., et al., *Induction of apoptosis by erucylphospho-N,N,N-trimethylammonium is associated with changes in signal molecule expression and location*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1010**: p. 307-10.
206. Chen, X., et al., *Combined PKC and MEK inhibition in uveal melanoma with GNAQ and GNA11 mutations*. Oncogene, 2014. **33**(39): p. 4724-34.
207. Hay, N. and N. Sonenberg, *Upstream and downstream of mTOR*. Genes Dev, 2004. **18**(16): p. 1926-45.
208. O'Reilly, K.E., et al., *mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt*. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1500-8.
209. Rodrik-Outmezguine, V.S., et al., *mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling*. Cancer Discov, 2011. **1**(3): p. 248-59.
210. Chandarlapaty, S., et al., *AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity*. Cancer Cell, 2011. **19**(1): p. 58-71.

211. Chakrabarty, A., et al., *Feedback upregulation of HER3 (ErbB3) expression and activity attenuates antitumor effect of PI3K inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(8): p. 2718-23.
212. Serra, V., et al., *PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer*. Oncogene, 2011. **30**(22): p. 2547-57.
213. Wen, H.C., et al., *Negative regulation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt signalling pathway by PKC*. Cell Signal, 2003. **15**(1): p. 37-45.
214. Bommakanti, R.K., S. Vinayak, and W.F. Simonds, *Dual regulation of Akt/protein kinase B by heterotrimeric G protein subunits*. J Biol Chem, 2000. **275**(49): p. 38870-6.
215. Pyne, N.J. and S. Pyne, *Receptor tyrosine kinase-G-protein-coupled receptor signalling platforms: out of the shadow?* Trends Pharmacol Sci, 2011. **32**(8): p. 443-50.
216. Wan, Y., T. Kurosaki, and X.Y. Huang, *Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors*. Nature, 1996. **380**(6574): p. 541-4.
217. Ebi, H., et al., *Receptor tyrosine kinases exert dominant control over PI3K signaling in human KRAS mutant colorectal cancers*. J Clin Invest, 2011. **121**(11): p. 4311-21.
218. Ambrosini, G., et al., *Overexpression of DDX43 mediates MEK inhibitor resistance through RAS Upregulation in uveal melanoma cells*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(8): p. 2073-80.
219. Little, A.S., et al., *Amplification of the driving oncogene, KRAS or BRAF, underpins acquired resistance to MEK1/2 inhibitors in colorectal cancer cells*. Sci Signal, 2011. **4**(166): p. ra17.
220. ClinicalTrials.gov. *A Phase Ib/II Study of AEB071 and MEK162 in Adult Patients With Metastatic Uveal Melanoma*. 2013 [cited 2017 14 Mar]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01801358?term=uveal+melanoma&rank=21>.
221. Musi, E., et al., *The phosphoinositide 3-kinase alpha selective inhibitor BYL719 enhances the effect of the protein kinase C inhibitor AEB071 in GNAQ/GNA11-mutant uveal melanoma cells*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(5): p. 1044-53.
222. ClinicalTrials.gov. *Trial of AEB071 in Combination With BYL719 in Patients With Melanoma*. 2014 [cited 2017 14 Mar]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02273219?term=uveal+melanoma&rank=48>.

Danksagung

Diese Dissertation wäre ohne die Unterstützung zahlreicher Personen in dieser Form nicht möglich gewesen. Hiermit möchte ich mich für die Hilfe, die ich erfahren habe, herzlichst bedanken.

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Kirsten Eibl für ihre kompetente und freundliche Unterschätzung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Doktorarbeit. Ich bedanke mich dafür, dass mir eine wissenschaftliche Aufarbeitung dieses Themas ermöglicht wurde und stets Vertrauen in meine Fähigkeiten und meine Arbeit entgegengebracht wurde.

Besonderer Dank geht an meinen Betreuer Herrn Dr. med. Christian Wertheimer. Ich bedanke mich für die zahlreichen und umfangreichen Gespräche, die vielen Ratschläge und Anmerkungen, aber auch die freundschaftliche und humorvolle Zusammenarbeit. Christian war durch seine Kompetenz und Hilfsbereitschaft ein wichtiger Ansprechpartner zu jedem Zeitpunkt. Für diese exzellente Betreuung bin ich sehr dankbar.

Für die vielfältige Unterstützung und freundliche Zusammenarbeit im Zelllabor möchte ich zudem den Mitarbeitern und Doktoranden Laure, Jakob, Stefan, Alexander und Nick danken. Ein herzliches Dankeschön gebürt zudem meinen langjährigen Mitbewohnern Severin, Maximilian, Lennart und Florian. Ich danke ihnen für die vielen wunderschönen Jahre in der WG. Meine Studienzeit wäre ohne sie nicht die gleiche gewesen.

Der größte Dank geht an meine Eltern Najwa und Walter sowie an meinen Bruder Marcel. Ich danke ihnen für ihre unermüdliche Unterstützung. Sie halten mir immer den Rücken frei und sind stets für mich da. Sie sind meine engsten Wegbegleiter auf jeder meiner bisherigen Lebensetappen und haben mich auch bei dieser Arbeit mit großem Engagement unterstützt. Als kleines Zeichen meiner Dankbarkeit hierfür ist diese Dissertation meiner Familie gewidmet.

Eidesstattliche Versicherung

Kafka, André Alexander Julian

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Pharmakologische Therapie des metastasierten Aderhautmelanoms: Bewertung neuer Wirkstoffe in der Zellkultur

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 18.10.2021

Ort, Datum

André Kafka

Unterschrift Doktorandin/Doktorand